



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08217799 A**(43) Date of publication of application: **27.08.96**

(51) Int. Cl

**C07K 16/24**  
**C07H 21/04**  
**C07K 16/46**  
**C12N 5/10**  
**C12N 15/02**  
**C12N 15/09**  
**C12P 21/08**  
**// A61K 39/395**  
**A61K 39/395**  
**A61K 39/395**  
**(C12N 5/10 , C12R 1:91 ), (C12P**  
**21/08 , C12R 1:91 )**

(21) Application number: **07177572**(22) Date of filing: **13.07.95**

(30) Priority: **13.07.94 JP 06161481**  
**24.11.94 JP 06289951**  
**14.12.94 JP 06310785**

(71) Applicant: **CHUGAI PHARMACEUT CO LTD**

(72) Inventor: **MATSUSHIMA TSUNAHARU**  
**MATSUMOTO YOSHIHIRO**  
**YAMADA YOSHIKI**  
**SATO ISAO**  
**TSUCHIYA MASAYUKI**  
**YAMAZAKI TATSUMI**

**(54) RECONSTITUTED HUMAN ANTIBODY AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-8**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the subject new antibody comprising light chain and heavy chain variable region of mouse monoclonal antibody against human interleukin-8 (IL-8) and human light chain and heavy chain stationary region and low in antigenicity to human and useful as medical therapy use, etc.

**CONSTITUTION:** This reconstituted human antibody is obtained by fusing a spleen cell collected by immunizing human IL-8 into a mouse with a mouse myeloma cell, cloning the fused cell to prepare hybridoma, separating

mRNA from the resultant hybridoma, using the hybridoma as a template to synthesize cDNA, cloning the cDNA with a primer to afford DNA coding a mouse monoclonal antibody light chain (L chain) variable region (V region) and a heavy chain (H chain) V region, each binding the mouse L chain V region DNA as well as human L chain stationary region (C region) DNA and human L chain V region framework region (FR) DNA, and the mouse H chain V region DNA as well as the human H chain C region DNA and the human H chain V region FR DNA to expression vectors and culturing a host cell transformed with these both expression vectors.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-217799

(43) 公開日 平成8年(1996)8月27日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/24		8517-4H	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 16/46			C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 5/10			C 1 2 P 21/08	
15/02			A 6 1 K 39/395	A B E
審査請求 未請求 請求項の数77 O L (全 45 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-177572	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月13日	(72) 発明者	松島 綱治 石川県金沢市つつじが丘210-9
(31) 優先権主張番号	特願平6-161481	(72) 発明者	松本 義弘 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外 製薬株式会社内
(32) 優先日	平6(1994)7月13日	(72) 発明者	山田 良樹 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外 製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(31) 優先権主張番号	特願平6-289951		
(32) 優先日	平6(1994)11月24日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願平6-310785		
(32) 優先日	平6(1994)12月14日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒトインターロイキン-8に対する再構成ヒト抗体

## (57) 【要約】

【構成】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、及び(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んでなるL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、及び(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成るヒトIL-8に対する再構成された抗体。

【効果】 この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは抗原性が低いことから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に医学療法用として期待される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトインターロイキン-8 (IL-8) に対するマウスモノクローナル抗体の軽鎖 (L鎖) 可変領域 (V領域)。

【請求項 2】 配列番号: 26 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項 1 に記載の L鎖 V領域。

【請求項 3】 ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) V領域。

【請求項 4】 配列番号: 27 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項 3 に記載の H鎖 V領域。

【請求項 5】 ヒト L鎖 定常領域 (C領域)、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L鎖 V領域を含んで成るキメラ L鎖。

【請求項 6】 前記マウス L鎖 V領域が配列番号: 26 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項 5 に記載のキメラ L鎖。

【請求項 7】 ヒト H鎖 C領域、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H鎖 V領域を含んで成るキメラ H鎖。

【請求項 8】 前記マウス H鎖 V領域が配列番号: 27 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項 7 に記載のキメラ H鎖。

【請求項 9】 (1) ヒト L鎖 定常領域 (C領域)、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L鎖 V領域を含んで成る L鎖; 並びに (2) ヒト H鎖 C領域、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H鎖 V領域を含んで成る H鎖; を含んで成るキメラ抗体。

【請求項 10】 前記マウス L鎖 V領域が配列番号: 26 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、そして前記マウス H鎖 V領域が配列番号: 27 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 9 に記載のキメラ抗体。

【請求項 11】 ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L鎖 V領域の相補性決定領域 (CDR)。

【請求項 12】 下記並びに配列番号: 26 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 11 に記載の CDR。

CDR 1 ; Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

CDR 2 ; Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

CDR 3 ; Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

【請求項 13】 ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H鎖 V領域の CDR。

【請求項 14】 下記並びに配列番号: 27 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 13 に記載の CDR。

CDR 1 ; Asp Tyr Tyr Leu Ser

CDR 2 ; Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly

CDR 3 ; Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

【請求項 15】 (1) ヒト L鎖 V領域のフレームワーク領域 (FR)、及び (2) ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L鎖 V領域の CDR、を含んで成るヒト IL-8 に対する抗体の再構成 (reshaped) ヒト L鎖 V領域。

【請求項 16】 前記 CDR が請求項 12 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 15 に記載の再構成ヒト L鎖 V領域。

【請求項 17】 前記 FR がヒト抗体 REI に由来する、請求項 15 又は 16 に記載の再構成ヒト L鎖 V領域。

【請求項 18】 前記 L鎖 V領域が、表 2 において RVLa 又は RVLb として示されるアミノ酸配列またはその一部を有する請求項 15 に記載の再構成ヒト L鎖 V領域。

【請求項 19】 (1) ヒト H鎖 V領域の FR、及び (2) ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H鎖 V領域の CDR、を含んで成る、ヒト IL-8 に対する抗体の再構成ヒト H鎖 V領域。

【請求項 20】 前記 CDR が請求項 14 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 19 に記載の再構成ヒト H鎖 V領域。

【請求項 21】 前記 FR 1, 2 及び 3 がヒト抗体 VD H 26 に由来し、および FR 4 がヒト抗体 4 B 4 に由来する、請求項 19 又は 20 に記載の再構成ヒト H鎖 V領域。

【請求項 22】 前記 H鎖 V領域が、表 3 および表 4 における RVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又は RVHh として示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 19 に記載の再構成ヒト H鎖 V領域。

【請求項 23】 (1) ヒト L鎖 C領域、並びに (2) ヒト L鎖 FR、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L鎖 CDR を含んで成る L鎖 V領域、を含んで成るヒト IL-8 に対する再構成ヒト抗体の L鎖。

【請求項 24】 前記ヒト L鎖 C領域がヒト C $\kappa$  領域であり、ヒト L鎖 FR が REI に由来し、前記 L鎖 CDR が請求項 12 に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 23 に記載の再構成ヒト抗体 L鎖。

【請求項 25】 前記 L鎖 V領域が表 2 において RVL a 又は RVL b として示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項 23 に記載の再構成ヒト抗体 L鎖。

【請求項 26】 (1) ヒト H鎖 C領域、並びに (2) ヒト H鎖 FR、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の H鎖 CDR を含んで成る H鎖 V領域、を含んで成るヒト IL-8 に対する再構成ヒト抗体の H

鎖。

【請求項27】 前記ヒトH鎖C領域がヒトC $\gamma$ 1領域であり、前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項26に記載の再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項28】 前記H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項26に記載の再構成ヒト抗体H鎖。

【請求項29】 (A) (1) ヒトL鎖C領域、並びに(2) ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域、を含んで成るL鎖；並びに

(B) (1) ヒトH鎖C領域、並びに(2) ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域、を含んで成るH鎖；を含んで成るヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体。

【請求項30】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項31】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し；前記ヒトL鎖FRがヒト抗体REIに由来し；前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記ヒトL鎖C領域はヒトC $\kappa$ 領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はヒトC $\gamma$ 1領域である、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項32】 前記L鎖CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し、前記H鎖CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有し；前記ヒトL鎖FRがヒト抗体REIに由来し；前記ヒトH鎖FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、FR4がヒト抗体4B4に由来し、前記ヒトL鎖C領域はC $\kappa$ 領域であり；そして前記ヒトH鎖C領域はC $\gamma$ 4である、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項33】 前記L鎖V領域が表2においてRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項34】 前記H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項29に記載の再構成ヒト抗体。

【請求項35】 (1) ヒトL鎖C領域；及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体のキメラL鎖をコードするDNA。

【請求項36】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項35に記載のDNA。

【請求項37】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項35に記載のDNA。

【請求項38】 (1) ヒトH鎖C領域；及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体のキメラH鎖をコードするDNA。

【請求項39】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項38に記載のDNA。

【請求項40】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項38に記載のDNA。

【請求項41】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項42】 前記L鎖V領域が配列番号：26に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項41に記載のDNA。

【請求項43】 前記L鎖V領域をコードするDNAが配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項41に記載のDNA。

【請求項44】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項45】 前記H鎖V領域が配列番号：27に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項44に記載のDNA。

【請求項46】 前記H鎖V領域をコードするDNAが配列番号：27に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項44に記載のDNA。

【請求項47】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項48】 前記CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項47に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項49】 前記CDRが配列番号：26に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項47に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項50】 ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRをコードするDNA。

【請求項51】 前記CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項50に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項52】 前記CDRが配列番号：27に示され

るヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項50に記載のCDRをコードするDNA。

【請求項53】 (1) ヒトL鎖V領域のFR、及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項54】 前記CDRが請求項12に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項53に記載の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項55】 前記FRがヒト抗体REIに由来する、請求項53又は54に記載の再構成ヒトL鎖V領域をコードするDNA。

【請求項56】 前記L鎖V領域が表2におけるRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項53に記載のDNA。

【請求項57】 配列番号：62又は配列番号：65に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項53に記載のDNA。

【請求項58】 (1) ヒトH鎖V領域のFR、及び(2) ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR、を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項59】 前記CDRが請求項14に示されるアミノ酸配列またはその一部を有する、請求項58に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項60】 前記FR1、2及び3がヒト抗体VDH26に由来し、並びにFR4がヒト抗体4B4に由来する、請求項58又は59に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項61】 H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項58に記載の再構成ヒトH鎖V領域をコードするDNA。

【請求項62】 配列番号：38, 41, 44, 45, 48, 51, 54又は55に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する、請求項58に記載のDNA。

【請求項63】 (1) ヒトL鎖C領域；並びに(2) ヒトFR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成るヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖をコードするDNA。

【請求項64】 前記L鎖V領域が表2におけるRVLa又はRVLbとして示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項63に記載のDNA。

【請求項65】 前記L鎖V領域が配列番号：62又は配列番号：65に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項63に記載のDNA。

【請求項66】 前記ヒトL鎖C領域がヒトL鎖C<sub>K</sub>領

域である請求項63, 64及び65のいずれか1項に記載のDNA。

【請求項67】 (1) ヒトH鎖C領域；並びに(2) ヒトFR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRを含んで成るH鎖V領域；を含んで成るヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖をコードするDNA。

【請求項68】 H鎖V領域が表3および表4におけるRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg、又はRVHhとして示されるアミノ酸配列またはその一部をコードする、請求項67に記載の再構成ヒトH鎖をコードするDNA。

【請求項69】 前記H鎖V領域が配列番号：38, 41, 44, 45, 48, 51, 54又は55に示されるヌクレオチド配列またはその一部を有する請求項67に記載のDNA。

【請求項70】 前記ヒトH鎖C領域がヒトH鎖C<sub>γ1</sub>領域である請求項67, 68及び69のいずれか1項に記載のDNA。

【請求項71】 前記ヒトH鎖C領域がヒトH鎖C<sub>γ4</sub>領域である請求項67, 68及び69のいずれか1項に記載のDNA。

【請求項72】 請求項35, 36, 37, 38, 39, 40, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70及び71のいずれか1項に記載のDNAを含んで成るベクター。

【請求項73】 請求項72に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項74】 ヒトIL-8に対するキメラ抗体の製造方法であって、請求項35, 36及び37のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクター及び請求項38, 39及び40のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項75】 ヒトIL-8に対するキメラ抗体の製造方法であって、請求項35, 36及び37のいずれか1項に記載のDNA及び請求項38, 39及び40のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項76】 ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体の製造方法であって、請求項63, 64, 65及び66のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクター及び請求項67, 68, 69, 70及び71のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより同時形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

【請求項77】 ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体の製造方法であって、請求項63, 64, 65及び66

のいずれか1項に記載のDNA及び請求項67, 68, 69, 70及び71のいずれか1項に記載のDNAを含んで成る発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、そして目的とする抗体を回収する、段階を含んで成る方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトインターロイキン-8 (IL-8) に対するマウスモノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) 及び可変領域 (V領域)、並びにヒトIL-8に対するヒト/マウスキメラ抗体、ヒト軽鎖 (L鎖) 可変領域及びヒト重鎖 (H鎖) 可変領域の相補性決定領域 (CDR) がヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている再構成 (reshaped) ヒト抗体に関する。本発明はさらに、上記の抗体又はその部分をコードするDNAを提供する。本発明はさらに、前記DNAを含んで成るベクター、特に発現ベクター、並びに該ベクターにより形質転換された宿主に関する。本発明はさらに、ヒトIL-8に対するキメラ抗体の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体の製造方法を提供する。

#### 【0002】

【従来の技術】インターロイキン-8 (IL-8) は、リポ多糖 (LPS) で刺激した単球の培養上清より見いだされ、monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) あるいはneutrophil activating protein-1 (NAP-1) 等と称されていた遊走性サイトカイン (chemokine) である。IL-8は様々な細胞により産生され、多形核白血球およびリンパ球に作用して、その濃度勾配に沿って遊走 (chemotaxis) させる活性を有している。また、好中球に対してはその遊走を誘導するばかりでなく、脱顆粒、活性酸素の放出、内皮細胞への接着亢進などの好中球の機能をも活性化させる作用を有している。

【0003】炎症性疾患、より詳しくは、嚢胞性肺線維症、特発性肺線維症、成人呼吸促迫症候群、サルコイドーシス、化膿性胸膜炎などの呼吸器疾患、並びに乾癬などの皮膚疾患、並びに慢性リウマチ関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎などの疾患においては、それらの病巣部位に白血球浸潤が病理学的に認められている。また、これら疾患の患者由来の被検物質に、IL-8が検出されており、炎症において中心的役割を果たしていると考えられている。

【0004】(McElvaney, N. G. ら、J. Clin. Invest., 90, 1296-1301, 1992、Lynch III, J. P. ら、Am. Rev. Respir. Dis., 145, 1433-1

439, 1992、Donnelly, S. C. ら、Lancet, 341, 643-647, 1993、Car, B. D. ら、Am. J. Respir. Crit. Care Med., 149, 655-659, 1994、Antony, V. B. ら、J. Immunol., 151, 7216-7223, 1993、Takematsu, H. ら、Arch. Dermatol., 129, 74-80, 1993、Brennan, F. M. ら、Eur. J. Immunol., 20, 2141-2144, 1990、Izzo, R. S. ら、Scand. J. Gastroenterol., 28, 296-300, 1993、Izzo, R. S. ら、Am. J. Gastroenterol., 87, 1447-1452, 1992)。

【0005】Ko, Y-C. らは、ヒトIL-8を抗原としてマウスに免疫することにより、ヒトIL-8に結合し、かつ、その結合によってヒトIL-8が好中球に結合することを阻害する、すなわちヒトIL-8が有する生物学的活性を中和するマウスモノクローナル抗体WS-4を調製した。マウスモノクローナル抗体WS-4のアイソタイプは、 $\kappa$ 型L鎖及び $\gamma$ 1型H鎖であることが明らかになっている (J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992)。

【0006】WS-4以外の抗ヒトIL-8抗体としては、A. 5. 12. 14 (Boylan, A. M. ら、J. Clin. Invest., 89, 1257-1267, 1992)、国際特許出願WO92-04372に開示されている抗Pep-1抗体または抗Pep-3抗体あるいはDM/C7 (Mulligan, M. S. ら、J. Immunol., 150, 5585-5595, 1993) 等が知られている。

【0007】家兎を用いた実験系に於て、マウスモノクローナル抗体WS-4を投与することによって、肺虚血・再灌流障害 (Sekido, N. ら、Nature, 365, 654-657, 1993)、LPS誘導の皮膚炎 (Harada, A. ら、Internat. Immunol., 5, 681-690, 1993)、LPSあるいはインターロイキン-1 (IL-1) 誘導の関節炎 (Akahoshi, T. ら、Lymphokine and Cytokine Res., 13, 113-116, 1994) における好中球浸潤が抑制されたことが見いだされた。

【0008】家兎にもヒトIL-8の相同体 (homologue) が存在し、ウサギIL-8と称されている。マウスモノクローナル抗体WS-4はウサギIL-8に対して交差反応し、ウサギIL-8がウサギ好中球に結合するのを阻害することが明らかになっている (Harada, A. ら、Internat. Immunol., 5, 681-690, 1993) ので、これらのことは、ヒトにおける炎症性疾患の治療のための療法

剤として抗ヒトIL-8抗体が有用であることを示唆している。

【0009】ヒト以外の哺乳類由来のモノクローナル抗体はヒトにおいて高度に免疫原性（「抗原性」という場合もある）があり、そしてこの理由のため、ヒトにおけるそれらの医学療法的価値は制限される。例えば、マウス抗体をヒトに投与しても異物として代謝されうるので、ヒトにおけるマウス抗体の半減期は比較的短く、期待された効果を十分に発揮できない。さらに、投与したマウス抗体に対して発生するヒト抗マウス抗体は、血清病あるいは他のアレルギー反応など、患者にとって不都合で危険な免疫応答を惹起する。そしてこの理由のため、ヒトにマウス抗体を頻回投与することはできない。

【0010】これらの問題を解決するため、ヒト型化（humanized）抗体の製造方法が開発された。マウス抗体は2つの方法でヒト型化することができる。より簡単な方法としては、可変領域（V領域）はもとのマウスモノクローナル抗体に由来し、定常領域（C領域）は適当なヒト抗体に由来するキメラ抗体を作製する方法がある。得られるキメラ抗体はもとのマウス抗体の可変領域を完全なかたちで含有するので、もとのマウス抗体と同一の特異性をもって抗原に結合することが期待できる。

【0011】さらに、キメラ抗体ではもとのマウス抗体に比べヒト以外の動物に由来する蛋白質配列の比率が実質的に減少しているためもとのマウス抗体に比べて免疫原性が低いと予想される。キメラ抗体は抗原によく結合しそして免疫原性が低いが、それでもなおマウス可変領域に対する免疫応答が生ずる可能性がある（LoBuglio, A. F. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224, 1989）。

【0012】マウス抗体をヒト型化するための第二の方法は一層複雑であるが、しかしマウス抗体が有する潜在的な免疫原性を大幅に低下させるものである。この方法においては、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域（complementarity determining region; CDR）のみをヒト可変領域に移植して「再構成」（reshaped）ヒト可変領域を作製する。ただし必要によっては、再構成ヒト可変領域のCDRの構造をより一層もとのマウス抗体の構造に近づけるために、CDRを支持しているフレームワーク領域（FR）の一部の蛋白質配列をマウス抗体の可変領域からヒト可変領域に移植する場合がある。

【0013】次に、これらの再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。最終的に再構成されたヒト抗体のヒト以外の蛋白質配列に由来する部分はCDR、および、極く一部のFRのみである。CDRは超可変蛋白質配列により構成されており、これらは種特異的配列を示さない。この理由のため、マウスCDRを担持する再構

成ヒト抗体はもはやヒトCDRを含有する天然ヒト抗体より強い免疫原性を有しないはずである。

【0014】再構成ヒト抗体についてはさらに、Reichmann, L. ら、Nature, 332, 323-327, 1988; Verhoeyen, M. ら、Science, 239, 1534-1536, 1988; Kettleborough, C. A. ら、Protein Eng., 4, 773-783, 1991; Maeda, H. ら、Hum. Antibodies Hybridomas, 2, 124-134, 1991; Gorman, S. D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Tempest, P. R. ら、Bio/Technology, 9, 266-271, 1991; Co, M. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869-2873, 1991; Carter, P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; Co, M. S. ら、J. Immunol., 148, 1149-1154, 1992; および Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993を参照のこと。

#### 【0015】

【発明が解決しようとする課題】前記のごとく、再構成ヒト抗体は療法目的のために有用であると予想されるが、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体は知られていない。さらに、再構成ヒト抗体の製造方法において任意の抗体に普遍的に適用し得る画一的方法は存在しない。従って、特定の抗原に対して十分な結合活性あるいは／ならびに中和活性を示す再構成ヒト抗体を作製するためには種々の工夫が必要である（例えば、Sato, K. ら、Cancer Res., 53, 851-856, 1993）。従って、本発明はヒトIL-8に対する、免疫原性の低い抗体を提供するものである。

#### 【0016】

【課題を解決するための手段】本発明はヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。本発明はまた、該再構成ヒト抗体の作製の過程で有用であるヒト／マウスキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、再構成ヒト抗体の断片を提供する。並びに本発明はキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそれらの断片の製造のための発現系を提供する。本発明はさらにまた、ヒトIL-8に対するキメラ抗体およびそれらの断片の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体およびそれらの断片の製造方法を提供する。

【0017】さらに具体的には、本発明は、（1）ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域；並びに（2）ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域；を提供する。本発明はさらに、（1）ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対する



マウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を提供する。

【0018】本発明はさらにまた、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対するキメラ抗体を提供する。本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域；を提供する。

【0019】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を提供する。本発明はさらにまた、(1)ヒトL鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域を含んで成るL鎖；並びに

(2)ヒトH鎖C領域、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域を含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対するキメラ抗体を提供する。

【0020】本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；並びに(2)ヒトIL-8に対するモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を提供する。本発明はさらに、(1)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を提供する。

【0021】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域；並びに(1)ヒトH鎖V領域のFR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域を提供する。

【0022】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域；並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖；並びに(1)ヒトH鎖C領域；並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域

域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖を提供する。

【0023】本発明はさらにまた、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のL鎖CDRを含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のH鎖CDRを含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。

【0024】本発明はさらに詳しくは(1)以下のアミノ酸配列に示す又はその一部を有する、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域のCDR、

CDR 1 ; Arg Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

CDR 2 ; Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

CDR 3 ; Gln His His Phe Gly Phe Pro Arg Thr

並びに(2)以下のアミノ酸配列に示す又はその一部を有する、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域のCDR、

CDR 1 ; Asp Tyr Tyr Leu Ser

CDR 2 ; Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr

Arg Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly

CDR 3 ; Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu Ala Tyr

を提供する。

【0025】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖V領域のフレームワーク領域(FR)；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖V領域；並びに(1)ヒトH鎖V領域のFR；並びに(2)ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖V領域のCDR；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖V領域を提供する。

【0026】本発明はさらに、(1)ヒトL鎖C領域；並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖CDRを含んで成るL鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトL鎖；並びに(1)ヒトH鎖C領域；並びに(2)ヒトH鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖CDRを含んで成るH鎖V領域；を含んで成る、ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトH鎖を提供する。

【0027】本発明はさらにまた、

(A) (1)ヒトL鎖C領域、並びに(2)ヒトL鎖FR、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のL鎖CDRを含んで成るL鎖；並びに

(B) (1)ヒトH鎖C領域、並びに(2)ヒトH鎖F



13

14

R、及びヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体WS-4のH鎖CDRを含んで成るH鎖；を含んで成る、ヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供する。\*

\*【0028】前記ヒトL鎖FRは以下のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

FR 1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
Tyr  
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala  
Thr Tyr Tyr Cys  
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0029】または、

FR 1 : Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser  
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
FR 2 : Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
Tyr  
FR 3 : Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala  
Thr Tyr Tyr Cys  
FR 4 : Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0030】前記ヒトH鎖FRは以下のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
Phe Ser  
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val Gly  
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
Tyr Cys Ala Arg  
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0031】

30

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
Phe Ser  
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly  
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
Tyr Cys Ala Arg  
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0032】

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
Phe Ser  
FR 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val Gly  
FR 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
Tyr Cys Ala Arg  
FR 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【0033】

FR 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

15

16

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【 0 0 3 4 】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【 0 0 3 5 】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser ;

【 0 0 3 6 】

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【 0 0 3 7 】 または、

F R 1 : Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

Phe Ser

F R 2 : Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly

F R 3 : Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr

Tyr Cys Ala Arg

F R 4 : Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【 0 0 3 8 】 本発明はまた、前記種々の抗体を構成するポリペプチド、又はその断片をコードするDNAに関する。本発明はまた、上記DNAを含んで成るベクター、例えば発現ベクターに関する。本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。本発明はさらにまた、ヒトIL-8に対するキメラ抗体およびその断片の製造方法、及びヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体およびその断片の製造方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

【 具体的な説明 】

マウスV領域をコードするDNAのクローニング

ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードする遺伝子をクローニングするためには、該遺伝子の取得源として、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することが必要である。ハイブリドーマからmRNAを抽出

50

した後、既知の方法により一本鎖cDNAに変換し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて目的とするDNAを増幅することで得られる。この遺伝子の取得源として、Ko, Y-C. らが作製した、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマWS-4があげられる。このハイブリドーマの作製方法はJ. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992に記載されており、これを参考例1に後記する。

#### 【0040】(1) 全RNAの採取

マウスモノクローナル抗体のV領域をコードする目的のDNAをクローン化するため、グアニジンチオシアネート処理によりハイブリドーマ細胞を破壊し、塩化セシウム密度勾配遠心(Chirgwin, J. M. ら, Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979)をおこなって全RNAを得ることができる。なお、他の蛋白質の遺伝子をクローニングする際に用いられたすでに報告されている方法、例えばバナジウム複合体などのリボヌクレアーゼ(RNase)インヒビター存在下で、界面活性剤処理、フェノール処理をおこなう方法(Berger, S. L. ら, Biochemistry, 18, 5143-5149, 1979)を用いることもできる。

#### 【0041】(2) cDNAの合成

次に、mRNAの3'末端に局在するpolyA鎖に相補的なオリゴヌクレオチドであるオリゴ(dT)をプライマーとして、上記のごとくして得た全RNAに含まれているmRNAを鋳型に、逆転写酵素で処理してmRNAに相補的な一本鎖cDNAを合成することができる

(Larrick, J. W. ら, Bio/Technology, 7, 934-938, 1989)。また、その時にランダムプライマーを用いても良い。なお、mRNAだけを取得する場合は、全RNAをオリゴdTセルロースカラムにかけpolyA鎖を有するmRNAだけを分離することができる。

#### 【0042】(3) ポリメラーゼ連鎖反応によるV領域をコードするDNAの増幅

次に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて前記V領域をコードするcDNAを特異的に増幅する。マウスモノクローナル抗体のカッパ( $\kappa$ )型L鎖V領域の増幅のため、配列番号: 1~11に示す11種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Variable; MKV)及び配列番号: 12に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Kappa Constant; MKC)をそれぞれ5'末端プライマー及び3'末端プライマーとして使用する。前記MKVプライマーはマウスカッパ型L鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MKCプライマーはマウスカッパ型L鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。

【0043】マウスモノクローナル抗体のH鎖V領域の増幅のため、配列番号: 13~24に示す12種のオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Variable; MHV)及び配列番号: 25に示すオリゴヌクレオチドプライマー(Mouse Heavy Constant; MHC)をそれぞれ5'末端プライマー及び3'末端プライマーとして使用する。前記MHVプライマーはマウスH鎖リーダー配列をコードするDNA配列とハイブリダイズし、そして前記MHCプライマーはマウスH鎖C領域をコードするDNA配列とハイブリダイズする。

【0044】なお、全ての5'末端プライマー(MKV及びMHV)はその5'末端近傍に制限酵素SalI切断部位を提供する配列GTCGACを含有し、そして、全ての3'末端プライマー(MKC及びMHC)はその5'末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有する。これらの制限酵素切断部位は両V領域をコードする目的のDNA断片をそれぞれのクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる。これらの制限酵素切断部位が、両V領域をコードする目的のDNA配列中にも存在する場合、それぞれのクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でも良い。

【0045】(4) V領域をコードするDNAの単離  
次に、目的とするマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNA断片を得るために、PCR増幅生成物を低融点アガロースゲルあるいはカラム[PCR産物精製用キット(QIAGEN PCR Purification Spin Kit: QIAGEN社製)、DNA精製用キット(GENECLEANII: BIO101社製)]等により、分離、精製をおこなう。その精製物を制限酵素SalI及びXmaIで酵素処理して、マウスモノクローナル抗体の目的とするV領域をコードするDNA断片を得る。

【0046】他方、プラスミドpUC19のごとき適当なクローニングベクターを同じ制限酵素SalI及びXmaIにより切断させ、このpUC19に前記DNA断片を酵素的に連結することにより、マウスモノクローナル抗体の目的とするV領域をコードするDNA断片を含むプラスミドを得る。クローニングされたDNAの配列決定は任意の常法に従って行うことができ、例えば、自動DNAシーケンサー(Applied Biosystems Inc. 製)が挙げられる。目的とするDNAのクローニング及びその配列決定を実施例1及び実施例2に具体的に記載する。

#### 【0047】相補性決定領域(CDR)

本発明はさらに、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域の超V領域又は相補性決定領域(CDR)を提供する。抗体のL鎖及びH鎖の両V領域は抗

原結合部位を形成する。L鎖及びH鎖上のこの領域は類似する基本的構造を有する。両鎖のV領域は配列が比較的保存された4個のフレームワーク領域を含み、それらは3個の超V領域又はCDRにより連結されている(Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, US Dept. Health and Human Services 1991)。

【0048】前記4個のフレームワーク領域(FR)の多くの部分は $\beta$ -シート構造をとり、3個のCDRはループを形成する。CDRはある場合には $\beta$ -シート構造の一部分を形成することもある。FRによって3個のCDRは相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして、対をなす3個のCDRと共に抗原結合部位の形成に寄与する。本発明は、ヒト型化抗体の素材として有用なこれらのCDR、及びそれをコードするDNAをも提供する。これらのCDR領域は、V領域の既知アミノ酸配列と照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から決定することができ、実施例3において具体的に説明する。

#### 【0049】キメラ抗体の作製

ヒトIL-8に対する抗体の再構成ヒトV領域を設計するに先立って、使用するCDRが実際に抗原結合領域を形成することを確認する必要がある。この目的のため、キメラ抗体を作製した。キメラ抗体を作製するためにキメラ抗体のL鎖並びにH鎖をコードするDNAを構築する必要がある。両DNAを構築する基本的な方法は、PCRクローン化cDNAに見られるマウスリーダー配列及びマウスV領域配列のそれぞれのDNA配列を、哺乳類細胞発現ベクター中にすでに存在するヒトC領域をコードするDNA配列に連結することである。

【0050】前記ヒト抗体C領域は、任意のヒトL鎖C領域および任意のヒトH鎖C領域であることができ、例えば、L鎖についてはヒトL鎖C $\kappa$ あるいはC $\lambda$ 、H鎖についてはIgGであればC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3あるいはC $\gamma$ 4(Elison, J. ら、DNA, 1, 11-18(1981), Takahashi, N. ら、Cell, 29, 671-679(1982), Krawinkel, U. ら、EMBO J. 1, 403-407(1982))あるいは他のアイソタイプをそれぞれ挙げることができる。

【0051】キメラ抗体の製造のためには2種類の発現ベクターを作製する。即ち、エンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域による制御のもとで、マウスL鎖V領域ならびにヒトL鎖C領域をコードするDNAを含んでなる発現ベクター、およびエンハンサー/プロモーター系のような発現制御領域による制御のもとで、マウスH鎖V領域ならびにヒトH鎖C領域をコードする

DNAを含んでなる発現ベクターを作製する。次に、これらの両発現ベクターにより哺乳類細胞などの宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロまたはインビボで培養してキメラ抗体を製造する(例えば、WO91-16928)。

【0052】あるいは、マウスL鎖V領域ならびにヒトL鎖C領域をコードするDNAおよびマウスH鎖V領域ならびにヒトH鎖C領域をコードするDNAを単一の発現ベクターに導入し、そして、該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、そして形質転換された細胞をインビトロまたはインビボで培養してキメラ抗体を製造することもできる。

【0053】モノクローナル抗体WS-4からのキメラ抗体の作製を実施例4に記載する。マウスWS-4 $\kappa$ 型L鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAをPCR法を用いてクローニングし、ヒトL鎖C $\kappa$ 領域をコードするヒトゲノムDNAを含有する発現ベクターに連結する。同様にマウスWS-4抗体のH鎖リーダー領域及びV領域をコードするcDNAをPCR法を用いてクローニングし、ヒトC $\gamma$ 1領域をコードするゲノムDNAを含有する発現ベクターに連結する。

【0054】より詳しくは、特に設計されたPCRプライマーを用いて、マウスWS-4抗体のV領域をコードするcDNAをそれらの5'及び3'末端において適当な塩基配列を導入して(1)それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つ(2)それらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした(例えば、本発明ではKozak配列を導入することにより転写効率を上げるよう工夫してある)。

【0055】次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たマウスWS-4抗体のV領域をコードするDNAを、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター(図1参照)に挿入した。これらのベクターは、種々の哺乳類細胞系における遺伝子操作された抗体の一過性(transient)発現又は安定な発現のために適当である。このように作製したキメラWS-4抗体の結合活性を試験したところ、キメラWS-4抗体はヒトIL-8に結合する活性を示した(図2参照)。従って、正しいマウスV領域がクローニングされ、そして正しく配列が決定されていたことが示された。

#### 【0056】再構成ヒトWS-4抗体の設計

マウスモノクローナル抗体のCDRがヒト抗体に移植されている再構成ヒト抗体を作製するためには、移植するCDRを有するマウスモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列と、CDRが移植されるヒトモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列との間に高い同一性が存在することが望ましい。

【0057】この目的のためには、マウスモノクローナル抗体のFRのアミノ酸配列とヒトモノクローナル抗体

のFRのアミノ酸配列とを比較することにより、再構成ヒトWS-4抗体のV領域の設計の基礎となるヒトV領域を選択することが可能になる。具体的には遺伝子解析ソフトGENETX (Software Development Co., Ltd.) を用いてマウスWS-4抗体のL鎖及びH鎖のV領域を、National Biomedical Research Foundation (NBRF) のデータベースに見出されるすべての既知のヒトのV領域と比較した。

【0058】マウスWS-4抗体のL鎖V領域は、既知のヒト抗体L鎖V領域との比較においてヒト抗体HAU (Watanabe, S. ら、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1291-1295, 1970) のL鎖V領域に最も類似しており、69.2%の同一性が存在する。一方、WS-4抗体のH鎖V領域は、既知のヒト抗体H鎖V領域との比較においてヒト抗体VDH26 (Bulwiel a., L. ら、EMBO J., 7, 2003-2010, 1988) に最も類似しており、71.4%の同一性が存在する。

\*20 【表1】

表1 マウスWS-4のV領域のFRと、種々のサブグループのヒトV領域のコンセンサス配列のFRとの間の同一性(%)

A. L鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
64.4	51.3	57.3	57.5

B. H鎖V領域におけるFR

HSG I	HSG II	HSG III
46.9	40.9	62.3

【0062】マウスWS-4抗体のL鎖V領域のFRはヒトL鎖V領域のサブグループI (HSG I) のFRのコンセンサス配列に最も類似しており、64.4%の同一性が存在する。一方、マウスWS-4のH鎖V領域のFRはヒトH鎖V領域のサブグループIII (HSG III) のFRのコンセンサス配列に最も類似しており、62.3%の同一性が存在する。

【0063】これらの結果は、既知のヒト抗体との比較から得られた結果を支持しており、ヒト抗体HAU中のL鎖V領域はヒトL鎖V領域のサブグループIに属し、そしてヒト抗体VDH26中のH鎖V領域はヒトH鎖V領域のサブグループIIIに属する。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の設計のためにはサブグループI (HSG I) に属するヒトL鎖V領域を使用し、そして再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の設計のためにはサブグループIII (HSG III) に属するヒト抗体H鎖V領域を用いるのが最善であろう。

【0064】既知ヒト抗体L鎖V領域との比較において、マウスWS-4抗体のL鎖V領域はヒトL鎖V領域

\*【0059】一般的に、マウスV領域のアミノ酸配列のヒトV領域のアミノ酸配列に対する同一性は、マウスV領域のアミノ酸配列に対する同一性よりも低い。これはマウスWS-4抗体のV領域がヒトV領域に完全には類似していないこと示し、そして同時に、ヒト患者における免疫原性の問題を解決するためにマウスWS-4のV領域をヒト型化する(humanize)ことが最善であることを示している。

【0060】マウスWS-4抗体のV領域をさらに、Kabata, E. A. ら、(1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Officeにより定義されるヒトV領域サブグループのコンセンサス配列と比較し、V領域のFR間で対比された。その結果を表1に示す。

【0061】

のサブグループIの1構成員であるヒト抗体REIのL鎖V領域にも類似していた。従って、再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の設計においてREIのFRを使用した。REIに基づくこれらのヒトFR中には、原著のヒトREI (Palm, W. ら、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356, 167-191, 1975; Epp, O. ら、Biochemistry, 14, 4943-4952, 1975) に比較して5個のアミノ酸(位置39, 71, 104, 105及び107; 表2を参照)の相違が存在する。

【0065】なお、表におけるアミノ酸番号はKabata, E. A. ら(1991)の経験に基づいている。位置39及び71における2個のアミノ酸の変化はラットCAMPATH-1H抗体のL鎖V領域のFR中に存在するアミノ酸にもどる変化であった(Riechman n ら、1988)。Kabata, E. A. ら(1991)によれば、FR4中の3個のアミノ酸の変化(位置104, 105及び107)は他のヒトL鎖からのJ領域に基いており、ヒトから逸脱するものではない。

23

【0066】再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の2つのバージョンを設計した。第一のバージョンRVL aにおいては、FRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に存在するREIに基づくFR (Riechmannら、1988)と同一であり、そしてCDRはマウスWS-4抗体のL鎖V領域中のCDRと同一にした。第二のバージョンRVL bはRVL aに基き、ヒトFR3中の位置71におけるアミノ酸1個のみを異にする。Chothia, C. ら、J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987により定義されるごとく、残基71はL鎖V領域のCDR1の標準的 (canonical) 構造の部分である。

表2 再構成ヒトWS-4 L鎖V領域の設計

	1	2	3	4
	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	
WS-4L	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RASEI IYSYLA	WYQQKQKGKSPQLLVY	
REI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC		WYQQKPGKAPKLLIY	
RVL a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASEI IYSYLA	WYQQKPGKAPKLLIY	
RVL b	-----	-----	-----	
	FR1	CDR1	FR2	
	5	6	7	8
	0123456	7890123456789012345678	901234567	
WS-4L	NAKTLAD	GVSSRFSGSGSGTQFSLRISSLPEDFGSYVC	QHHFGFPRT	
REI		GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDIATYYC		
RVL a	NAKTLAD	GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDIATYYC	QHHFGFPRT	
RVL b	-----	-----Y-----	-----	
	CDR2	FR3	CDR3	
	10			
	8901234567			
WS-4L	FGGGTKLBK			
REI	FGGGTKV <del>E</del> IK			
RVL a	FGGGTKVEIK			
RVL b	-----			
	FR4			

【0069】注：REIのFRは再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中に見出されるものである (Riechmannら、1988)。REIのFR中の5個の下線を付したアミノ酸はヒトREIのアミノ酸配列と異なるアミノ酸である。なお、アミノ酸は一文字表記による。アミノ酸番号はKabataらの定義によるものである。マウスWS-4抗体のH鎖V領域中のFRはサブグループIIIに属するヒトH鎖V領域に最も類似している (表1)。

【0070】マウスWS-4抗体のH鎖V領域は、既知のヒトH鎖V領域との比較において、FR1からFR3までは、ヒトH鎖V領域のサブグループIIIの1構成員

24

\* 【0067】この位置のアミノ酸はL鎖V領域のCDR1ループの構造に直接影響すると予想され、それ故に抗体結合に大きく影響すると考えられている。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域のRVL bにおいては、位置71のフェニルアラニンがチロシンに変えられている。表2は、マウスWS-4抗体のL鎖V領域、再構成ヒトCAMPATH-1H抗体中での使用のために修飾されたREIのFR (Riechmannら、1988)及び再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域の2種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

【0068】

【表2】

であるヒト抗体VDH26のH鎖V領域 (Bulwella, L. ら、EMBO J., 7, 2003-2010, 1988)に最も類似していた。FR4については、VDH26のFR4の配列が明らかになっていなかったため、サブグループIIIに属するヒト抗体4B4 (Sanz, I. ら、J. Immunol., 142, 883-887, 1989)のFR4のアミノ酸配列を用いることとした。これらのヒトH鎖V領域を、再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の設計のための基礎として用いた。

【0071】再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の8種類のバージョンを設計した。8種類のバージョンのすべ

25

てにおいて、ヒトFR1、2及び3はヒト抗体VDH26のFR1、2及び3に、FR4はヒト抗体4B4のFR4に基いており、そして、マウスCDRはマウスWS-4抗体H鎖V領域のCDRと同一である。表3および4に、マウスWS-4抗体のH鎖V領域、鋳型のヒト抗\*

26

\*体VDH26のFR1~3、ヒト抗体4B4のFR4および再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の8種類のバージョンの、それぞれのアミノ酸配列を示す。

【0072】

【表3】

再構成ヒトWS-4 H鎖V領域の設計(表4につづく)

	1	2	3
	123456789012345678901234567890	12345	
WS-4H	EVKLVBSSGGGLIQPGDSLRLSCVTSGPTFS	DYYLS	
VDH26	EVQLLESFGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFS		
RVHa~h	EVQLLESFGGGLVQPGGSLRLSCAASGPTFS	DYYLS	
	FR1	CDR1	
	4	5	6
	67890123456789	012ABC3456789012345	
WS-4H	WVRQPPGKALEWVG	LIRNKANGYTREYSASVKG	
VDH26	WVRQAQGGKLELVG		
RVHa	WVRQAQGGKLELVG	LIRNKANGYTREYSASVKG	
RVHb	-----W--	-----	
RVHc	----P-----	-----	
RVHd	----P----W--	-----	
RVHe	---PP----W--	-----	
RVHf	----P--A--W--	-----	
RVHg	----P----W--	-----	
RVHh	-----W--	-----	
	FR2	CDR2	

【0073】

30 【表4】



	7	8	9	100
	67890123456789012ABC345678901234			567890ABC12
WS-4H	RFTISRDDSQSILYLQMNTRLRGEDSATYYCAR			BNYRYDVELAY
VDH26	RLTISRREDSKNTLYLQMSSLKTEDLAVYYCAR			
RVHa	RLTISRREDSKNTLYLQMSSLKTEDLAVYYCAR			BNYRYDVELAY
RVHb	-----			-----
RVHc	-----			-----
RVHd	-----			-----
RVHe	-----			-----
RVHf	-----			-----
RVHg	-F-----			-----
RVHh	-F-----			-----

FR3

CDR3

110

	34567890123	注: RVHa~h はRVHa, RVHb, RVHc, RVHd, RVHe, RVHf, RVHg及びRVHhを示す。
WS-4H	WGQGTLLTVSA	
4B4	WGQGTLLTVSS	なお、アミノ酸は一文字表記による。
RVHa~h	WGQGTLLTVSS	アミノ酸番号は Kabaiらの定義によるものである。

FR4

#### 【0074】再構成ヒトWS-4抗体V領域をコードするDNAの作製

再構成ヒトWS-4抗体V領域の作製を実施例5に具体的に記載する。再構成ヒトWS-4抗体L鎖及びH鎖V領域のそれぞれの第一バージョンをコードするDNAを合成した。そして配列決定して、再構成ヒトWS-4抗体L鎖及びH鎖V領域のバージョン「a」の全体DNA配列が正しいアミノ酸配列をコードしていることを確認した。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号: 62に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域バージョン「a」の配列を配列番号: 38に示す。

【0075】再構成ヒトWS-4抗体V領域の他のバージョンをコードするDNAは、第一バージョン「a」を鋳型に、公表されているPCR-変異誘発法 (Kammann, Mら、Nucleic Acids Res., 17, 5404, 1989) にわずかな変更を加えた方法を用いて作製した。再構成ヒトWS-4抗体V領域の設計に関して記載したように、再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の1つの追加のバージョン (バージョン「b」) をコードするDNAを作製し、そして再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の7種類の追加のバージョン (バージョン「b」, 「c」, 「d」, 「e」, 「f」, 「g」及び「h」) をコードするDNAを作製した。

【0076】これらの追加のバージョンは、第一バージョンからのアミノ酸配列の一連の微細な変化を含み、アミノ酸配列のこれらの微細な変化はPCR変異誘発を用いてDNA配列の微細な変更を行うことにより達成された。DNA配列に必要な変化を導入するPCRプライマーが設計された。一連のPCR反応に続き、PCR生成物をクローン化し、そして配列決定してDNA配列中の変化が計画通りに起っていることを確認した。再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域バージョン「b」の配列を配列番号: 65に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域バージョン「b」, 「c」, 「d」, 「e」, 「f」, 「g」, 「h」のそれぞれの配列を配列番号41, 44, 45, 48, 51, 54, 55に示す。

【0077】再構成ヒトWS-4抗体V領域の種々のバージョンのDNA配列を配列決定により確認した後、再構成ヒトWS-4抗体V領域をコードするDNAを、ヒトC領域をコードするDNAをすでに含有する哺乳類細胞発現ベクターにサブクローニングした。即ち、再構成ヒトWS-4抗体V鎖L領域をコードするDNAをヒトL鎖C領域をコードするDNA配列に、再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードするDNAをヒトC $\gamma$ 1領域をコードするDNA配列にそれぞれ連結した。

【0078】次に再構成ヒトL鎖V領域バージョン「a」あるいは「b」と、H鎖V領域バージョン「a」~「h」のすべての組合せをヒトIL-8への結合につ

いて試験し、そしてその結果、図 7 に記載するように、L 鎖バージョン「a」または「b」と H 鎖バージョン「g」とを含んで成る両再構成ヒト抗体 (RVL a/RVH g 及び RVL b/RVH g) がキメラ WS-4 抗体と同じレベルで IL-8 に結合する能力を示した。

【0079】ヒト IL-8 に対する本発明のキメラ抗体又は再構成ヒト抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明のキメラ抗体又は再構成抗体は哺乳類細胞、例えば COS 細胞又は CHO 細胞中で発現される。

【0080】これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス前期 (human cytomegalovirus immediate early; HCMV) プロモーターを使用するのが好ましい。HCMV プロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HC $\gamma$ 1、HCMV-VL-HC $\kappa$  等があり、pSV2neo に由来するもの (国際公開出願 WO92-19759 を参照) が含まれる。

【0081】また、その他に本発明に用いることのできる哺乳動物細胞に於ける遺伝子発現のプロモーターとしては、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス 40 (SV40) 等のウイルスプロモーター、あるいは、ヒト・ポリペプチド・チェーン・エロンゲーション・ファクター-1 $\alpha$  (HEF-1 $\alpha$ ) 等の哺乳動物細胞由来のプロモーターを用いればよい。例えば、SV40 のプロモーターを使用する場合は、Mulligan, R. C. らの方法 (Nature, 277, 108-114, 1979)、また、HEF-1 $\alpha$  プロモーターを使用する場合は、Mizushima, S. らの方法 (Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990) に従えば実施することができる。

【0082】本発明のために有用なプロモーターの他の具体例は HEF-1 $\alpha$  プロモーターである。このプロモーターを含有する発現ベクターには HEF-VH-g $\gamma$ 1 及び HEF-VL-g $\kappa$  (図 1) が含まれる。複製起点としては、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、SV40、牛パピローマウイルス (BPV) 等の由来の DNA 配列を用いることができ、さらに、宿主細胞系中での遺伝子コピー数増幅のため、選択マーカーとして、アミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼあるいは neo 耐性遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR T) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子を用いることができる。

【0083】要約すれば、本発明はまず、ヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体の L 鎖 V 領域及び H 鎖 V 領域、並びに該 L 鎖 V 領域をコードする DNA 及び該 H 鎖 V 領域をコードする DNA を提供する。これらは、ヒト IL-8 に対するヒト/マウスキメラ抗体及び再構成ヒト抗体の作製のために有用である。モノクローナル抗体としては、例えば WS-4 があげられる。L 鎖 V 領域は例えば配列番号: 26 に示すアミノ酸配列を有し、そして H 鎖 V 領域は例えば配列番号: 27 に示すアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列は例えばそれぞれ配列番号: 26, 27 に示すヌクレオチド配列によりコードされている。

【0084】本発明のヒト IL-8 に対するキメラ抗体は、(1) ヒト L 鎖 C 領域及びマウス L 鎖 V 領域; 並びに (2) ヒト H 鎖 C 領域及びマウス H 鎖 V 領域; から構成される。マウス L 鎖 V 領域及びマウス H 鎖 V 領域並びにこれらをコードする DNA は前記の通りである。前記ヒト L 鎖 C 領域は任意のヒト L 鎖 C 領域であることができ、そして例えばヒト C $\kappa$  あるいは C $\lambda$  領域である。前記ヒト H 鎖 C 領域は任意のヒト H 鎖 C 領域であることができ、そして例えばヒト C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 あるいは C $\gamma$ 4 領域 (Ellison, J. ら、DNA, 1, 11-18 (1981), Takahashi, N. ら、Cell, 29, 671-679 (1982), Krawinkel, U. ら、EMBO J., 1, 403-407 (1982)) である。

【0085】キメラ抗体の製造のためには 2 種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとでマウス L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA を含んで成る発現ベクター、並びにエンハンサー/プロモーター系のごとき発現制御領域のもとでマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA を含んで成る発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターにより哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そして形質転換された細胞をインービトロ又はインービボで培養してキメラ抗体を製造する。

【0086】あるいは、マウス L 鎖 V 領域及びヒト L 鎖 C 領域をコードする DNA 並びにマウス H 鎖 V 領域及びヒト H 鎖 C 領域をコードする DNA を単一の発現ベクターに導入し、そして該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、次にこの形質転換された宿主をインービボ又はインービトロで培養して目的とするキメラ抗体を生産させる。

【0087】本発明の再構成ヒト WS-4 抗体は、

(A) (1) ヒト L 鎖 C 領域、及び (2) ヒト L 鎖 FR、及びヒト IL-8 に対するマウスモノクローナル抗体 WS-4 の L 鎖 CDR を含んで成る L 鎖 V 領域、を含んで成る L 鎖; 並びに

(B) (1) ヒト H 鎖 C 領域、及び (2) ヒト H 鎖 F

31

R、及びヒト I L-8 に対するマウスモノクローナル抗体 WS-4 の H 鎖 CDR を含んで成る H 鎖 V 領域、を含んで成る H 鎖；から構成される。

【0088】好ましい態様においては、前記 L 鎖 CDR は配列番号：26 に示されるアミノ酸配列であって、該アミノ酸配列の範囲が表 5 において定義されるアミノ酸配列を有し、前記 H 鎖 CDR は配列番号：27 に示されるアミノ酸配列であって該アミノ酸配列の範囲が表 5 において定義されるアミノ酸配列を有し；前記ヒト L 鎖 FR が R E I に由来するものであり；前記ヒト H 鎖 FR 1、2 および 3 は V D H 26 に、FR 4 は 4 B 4 に由来するものであり；前記ヒト L 鎖 C 領域はヒト C $\kappa$  領域であり；そして前記ヒト H 鎖 C 領域はヒト C $\gamma$  1 領域である。また、前記ヒト H 鎖 C 領域はヒト C $\gamma$  4 領域であってもよく、あるいは前記ヒト L 鎖 C 領域および／またはヒト H 鎖 C 領域のかわりにラジオアイソトープを結合させてもよい。特定の抗原に対して十分に活性がある再構成ヒト抗体を作製するために、前記ヒト FR のアミノ酸配列の一部を置換することが望ましい。

【0089】好ましい態様においては、L 鎖 V 領域は表 2 において R V L a あるいは R V L b として示されるアミノ酸配列を有し、H 鎖 V 領域は表 3 および表 4 に R V H a、R V H b、R V H c、R V H d、R V H e、R V H f、R V H g 又は R V H h として示されるアミノ酸配列を有する。さらに、H 鎖 V 領域 FR 2 中の 41 位のアミノ酸がプロリンであること、同 47 位のアミノ酸がトリプトファンであること、および／または同 FR 3 中の 67 位のアミノ酸がフェニルアラニンであることがよく、R V H b、R V H d、R V H e、R V H f、R V H g 又は R V H h として示されるアミノ酸配列を有するものがより好ましい。このうち、R V H g が H 鎖 V 領域として最も好ましい。

【0090】再構成抗体の製造のためには、2 種類の発現ベクター、すなわちエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域による制御のもとに前に定義した再構成ヒト L 鎖をコードする DNA を含んで成る発現ベクター、及びエンハンサー／プロモーター系のごとき発現制御領域のもとに前に定義した再構成ヒト H 鎖をコードする DNA を含んで成るもう一つの発現ベクターを作製する。次に、これらの発現ベクターを用いて哺乳類細胞のごとき宿主細胞を同時形質転換し、そしてこの形質転換された細胞をインービボ又はインービトロで培養して再構成ヒト抗体を生産せしめる。

【0091】あるいは、再構成ヒト L 鎖をコードする DNA 及び再構成ヒト H 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに導入し、そしてこのベクターを用いて宿主を形質転換し、次にこの形質転換された宿主細胞をインービボ又はインービトロで培養して目的とする再構成ヒト抗体を生産せしめる。こうして生産されたキメラ抗体又は再構成ヒト抗体は、常法に従って、例えばプロテ

32

ン A アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により単離、精製することができる。

【0092】本発明のキメラ L 鎖又は再構成ヒト L 鎖は H 鎖と組合わせることにより完全な抗体を作製するために使用することができる。同様に本発明のキメラ H 鎖又は再構成ヒト H 鎖は L 鎖と組合わせることにより完全な抗体を作製するために用いることができる。本発明のマウス L 鎖 V 領域、再構成ヒト L 鎖 V 領域、マウス H 鎖 V 領域、及び再構成ヒト H 鎖 V 領域は、本来、抗原であるヒト I L-8 と結合する領域であり、それ自体として、又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。また、本発明の L 鎖 V 領域 CDR 及び H 鎖 V 領域 CDR も、本来、抗原であるヒト I L-8 と結合する部分であり、それ自体として又は他の蛋白質との融合蛋白質として医薬、診断薬等として有用であると考えられる。

【0093】本発明のマウス L 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ L 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。同様にマウス H 鎖 V 領域をコードする DNA はキメラ H 鎖をコードする DNA 又は再構成ヒト H 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。また、本発明の L 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト L 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト L 鎖をコードする DNA の作製のために有用である。

【0094】同様に本発明の H 鎖 V 領域 CDR をコードする DNA は再構成ヒト H 鎖 V 領域をコードする DNA 及び再構成ヒト H 鎖をコードする DNA 作製のために有用である。さらには、再構成ヒト抗体の F (a b')<sub>2</sub>、F a b あるいは F v を、又は、H 鎖及び L 鎖の両 F v を連結させたシングルチェーン F v を適当な宿主で産生させ、前述の目的に使用することができる（例えば、Bird, R. E. ら、TIBTECH, 9, 132-137, 1991 を参照）。

【0095】シングルチェーン F v は、ヒト I L-8 に対する再構成ヒト抗体の H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域を連結してなる。このシングルチェーン F v において、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリ

ンカーを介して連結されている（Huston, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 5879-5883, 1988）。

【0096】シングルチェーン F v における H 鎖 V 領域および L 鎖 V 領域は、再構成ヒト抗体の H 鎖および L 鎖 V 領域として前記記載されたもののいずれであってもよい。具体例として、配列番号 38, 41, 44, 45, 48, 51, 54, 55 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる H 鎖 V 領域と、配列番号 62, 65 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる L 鎖 V 領域を含んでなるシングルチェーン F v が挙げられる（WO 88-01

649を参照)。これらのV領域は、好ましくは、ペプチドリンカーによって連結されている。ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる(WO88-09344を参照)。

【0097】シングルチェーンFvをコードするDNAは、前記記載の再構成ヒト抗体のH鎖または、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖または、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いて、PCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0098】また、一旦シングルチェーンFvをコードするDNAが作成されれば、それらを含有する発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、シングルチェーンFvを得ることができる。シングルチェーンFvは、抗体分子に比べ、組織への移行性が優れており、ラジオアイソトープ標識によるイメージングへの利用、および再構成ヒト抗体と同様の機能を有する治療剤としての利用が期待される。

【0099】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvの結合活性を確認する方法として、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、キメラ抗体、再構成ヒト抗体について、酵素免疫測定法を用いる場合、抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体をコートしたプレートにヒトIL-8を添加し、ここにヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体を産生する細胞の培養上清あるいは精製サンプルを加え、アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した適切な二次抗体を添加する。プレートのインキュベーションおよび洗浄の後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

【0100】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvのIL-8レセプターに対するIL-8結合阻害活性は、通常のリガンドレセプター結合阻害アッセイにより評価される。例えば、好中球上のIL-8レセプターに対するIL-8の結合阻害アッセイには、ヘパリン採血などにより得られる好中球を遠心分離等の手段で分離した後、上記アッセイに好適な数の細胞懸濁液となるよう調製して用いることができる。

【0101】<sup>125</sup>Iなどで適当に標識したIL-8と非標識のIL-8を含む溶液と適当な濃度に調製した本発明の抗体またはその断片を含む溶液を混合し、次いでこれを上記好中球懸濁液に添加する。一定時間の後、好中球を分離し、好中球上の標識された活性を測定すればよい。本発明の抗体またはその断片による好中球遊走作用(ケモタキシス; chemotaxis)の阻害能を評価するには通常知られた方法、例えばGrob, P. M.らJ. Biol. Chem., 265, 8311-8316, 1990に記載された方法を用いることができる。

【0102】市販のケモタキシスチャンバーを用いる場合、本発明の抗体またはその断片を適当な培養液で希釈した後、IL-8を加え、これをチャンバーに分注する。ついで、調製した好中球懸濁液をチャンバーに添加し、一定時間放置する。遊走する好中球は、チャンバーに装着されたフィルターに付着するので、その好中球の数を染色液あるいは蛍光抗体等の通常の方法で測定すればよい。また、顕微鏡下での肉眼による判定や機械を用いる自動測定も可能である。

【0103】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvは、メンブレンフィルターによる濾過滅菌の後、好ましくは非経口的に、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等によりあるいは経気道的に、例えばネブライザー(nebulizer)により医薬療法剤として投与することができる。ヒトに対する投与量は、患者の状態、年齢等により異なるがおよそ1～1000mg/bodyであり、1～10mg/kg/週の分割用量を選択することができる。

【0104】本発明のヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvは、精製され結合活性を評価された後に、生理活性タンパク質の製剤化に通常用いられる方法により、医薬療法剤として製剤化される。たとえば、注射用製剤は精製されたヒトIL-8に対するキメラ抗体、再構成ヒト抗体およびそのF(ab')<sub>2</sub>、Fab、FvあるいはシングルチェーンFvを、溶剤、例えば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに吸着防止剤、例えば、Tween 80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)などを加えたものであり、または使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては、糖アルコール又は糖、例えばマンニトール、ブドウ糖などを用いることができる。

【0105】

【実施例】次に、本発明を下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

# 実施例1. ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のV領域をコードするDNAのクローニング

ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローニングした。

## 【0106】1. 全RNAの調製

ハイブリドーマWS-4からの全RNAを、Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979により記載されている塩化セシウム密度勾配遠心法を修飾して調製した。すなわち、 $1 \times 10^7$  個のハイブリドーマWS-4の細胞を25mlの4Mグアニジンチオシアネート (Fulka社製) 中で完全にホモジナイズさせた。ホモジネートを遠心管中の5.7M塩化セシウム溶液層上に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpmにて20℃で14時間遠心分離することによりRNAを沈澱させた。

【0107】RNA沈澱物を80%エタノールにより洗浄し、そして10mM EDTA及び0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) 200 $\mu$ l中に溶解し、そしてそれにProteinase (Boehringer社製) を0.5mg/mlとなるように添加した後、37℃にて30分間温浴中でインキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、そしてRNAをエタノールで沈澱させた。次に、RNA沈澱物を1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) 200 $\mu$ lに溶解した。

## 【0108】2. メッセンジャーRNA (mRNA) の抽出

マウスモノクローナル抗体WS-4 H鎖をコードするmRNAを抽出するため、Fast Track mRNA Isolation Kit Version 3.2 (Invitrogen社製) を用いて、その指示書に記載の方法に従い、上記1. で得られた全RNAからpoly (A) ポジティブなmRNAを抽出した。

## 【0109】3. 一本鎖cDNAの合成

cDNA Cycle Kit (Invitrogen社製) を用いて、その指示書に記載の方法に従い、上記2. で得られた約40ngのmRNAより一本鎖cDNAを合成し、マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅に用いた。尚、マウスL鎖V領域をコードするcDNAを増幅するために、約10 $\mu$ gの上記全RNAより一本鎖cDNAを合成した。

## 【0110】4. 抗体可変領域をコードする遺伝子のPCR法による増幅

(1) マウスH鎖V領域をコードするcDNAの増幅  
PCRのためのプライマーは、配列番号: 13~24に示すMHV (Mouse Heavy Variable) プライマー1~12、及び配列番号: 25に示すM

HC (Mouse Heavy Constant) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0111】PCR溶液100 $\mu$ lは、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 0.1mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (W/V) ゼラチン, 5ユニットのDNAポリメラーゼAmpliTaq (Perkin Elmer Cetus社)、0.25 $\mu$ Mの配列番号: 13~24に示すMHVプライマーのうち一つと1.75 $\mu$ Mの配列番号: 25に示すMHCプライマー及び上記3. で得られた一本鎖cDNA溶液1.5 $\mu$ lを含有し、MHV1~12プライマーの各々について別々に用意した。これを50 $\mu$ lの鉱油で覆った後、94℃の初期温度にて3分間そして次に94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間、この順序で加熱した。この温度サイクルを30回反復した後、反応混合物をさらに72℃にて10分間インキュベートした。

## 【0112】(2) マウスL鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号: 1~11に示すMKV (Mouse Kappa Variable) プライマー1~11、及び配列番号: 12に示すMKC (Mouse Kappa Constant) プライマー (Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を使用した。

【0113】cDNAの増幅は、それぞれ0.25 $\mu$ MのMKVプライマー混合物と3.0 $\mu$ MのMKCプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記4. (1) においてH鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により上記3. で得られた一本鎖cDNA溶液2.0 $\mu$ lから増幅を行なった。

【0114】5. PCR生成物の精製および断片化  
前記のようにしてPCR法により増幅したH鎖V領域およびL鎖V領域それぞれのDNA断片を1.5%低融点アガロース (Sigma社製) を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。約450bp長のH鎖DNA断片と約400bp長のL鎖DNA断片を含有するアガロース片をそれぞれ切り取り、そして65℃にて5分間溶解せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び300mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5) を加えた。

【0115】この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5) に溶解した。次に、10mM MgCl<sub>2</sub> 及び1mMジチオスレイトールを含有する100mM Tris-HCl (pH7.9) 中で5ユニットの

37

制限酵素Xma I (New England BioLabs社製)を用いて37℃にて3時間消化した。次に、40ユニットの制限酵素Sal I (宝酒造社製)により37℃にて2時間消化し、そして生ずるDNA断片を、1.5%低融点アガロース (Sigma社製)を用いるアガロースゲル電気泳動により分離した。

【0116】DNA断片を含有するアガロース片を切り取りそして65℃にて5分間溶解せしめ、そしてこれと同容積の2mM EDTA及び300mM NaClを含有する20mM Tris-HCl (pH7.5)を加えた。この混合物をフェノール及びクロロホルムにより抽出し、そしてDNA断片をエタノール沈澱により回収し、そして1mM EDTAを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解した。こうして、マウスκ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片、及びマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るDNA断片を各々得た。上記DNA断片はいずれもその5'末端にSal I接着末端を有し、そしてその3'末端にXma I接着末端を有する。

【0117】6. 連結及び形質転換

上記のようにして調製したマウスカッパ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含んで成るSal I-Xma I DNA断片約0.3μgを、Sal I、Xma I及び大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ (BAP; 宝酒造社製)で消化することにより調製したpUC19ベクター (宝酒造社製)約0.1μgと、1ユニットT4 DNAリガーゼ (GIBCO BRL社製)及び添付のバッファーを含有する反応混液中で、16℃にて4時間反応させ連結した。

【0118】次に、5μlの上記連結混合物を大腸菌DH5αのコンピテント細胞 (GIBCO BRL社製)50μlに加え、そしてこの細胞を氷上で30分間、42℃にて1分間そして再び氷上で1分間静置した。次いで400μlの2×YT培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))を加え、37℃にて1時間インキュベートした後、50μg/mlのアンプシリン (明治製菓社製)を含有する2×YT寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989))上にこの大腸菌をまき、37℃にて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

【0119】尚、この際選択マーカーとしてX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside, 宝酒造社製)

38

50μgを塗布した。この形質転換体を、50μg/mlのアンプシリンを含有する2×YT培地10ml中で37℃にて一夜培養し、そしてこの培養物から、QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN社製)を用いて、その指示書に記載の方法に従ってプラスミドDNAを調製した。

【0120】こうして得られた、ハイブリドーマWS-4に由来するマウスκ型L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをpUC-WS4-VLと命名した。大腸菌コンピテント細胞をJM109を用いた点を除いて、上記の同じ方法に従って、ハイブリドーマWS-4に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをSal I-Xma I DNA断片から作成し、そしてpUC-WS4-VHと命名した。

【0121】実施例2. DNAの塩基配列の決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を、シーケンズプライマーとしてM13 Primer RVおよびM13 Primer M4 (両者とも宝酒造社製)、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem Inc製)およびTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem Inc製)を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って塩基配列を決定した。プラスミドpUC-WS4-VLに含まれるマウスWS-4抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 26に示す。また、プラスミドpUC-WS4-VHに含まれるマウスWS-4抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 27に示す。

【0122】実施例3. CDRの決定

L鎖及びH鎖のV領域の基本的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク領域が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、[Sequences of Proteins of Immunological Interest] U S Dept. Health and Human Services, 1991)。

【0123】この様な事実に基づき、ヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表5に示す如く決定した。

【0124】

【表5】

39

40

マウスWS-4抗体のL鎖V領域ならびにH鎖V領域中のCDR

プラスミド	配列番号	CDR1	CDR2	CDR3
pUC-WS4-VL	26	24-34	50-56	89-97
pUC-WS4-VH	27	31-35	50-68	101-111

#### 【0125】実施例4. クローン化cDNAの発現の確認 (キメラWS-4抗体の作製)

##### 発現ベクターの作製

キメラWS-4抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウスWS-4 L鎖及びH鎖V領域をコードするcDNAクローンpUC-WS4-VL及びpUC-WS4-VHをPCR法により修飾した。そしてHEF発現ベクター (前記、WO92-19759及び図1を参照のこと) に導入した。

【0126】L鎖V領域のための後方プライマー (配列番号: 28) 及びH鎖V領域のための後方プライマー (配列番号: 29) は、各々のV領域のリーダー配列の最初をコードするDNAにハイブリダイズし且つKozakコンセンサス配列 (Kozak, M. ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987) 及びHindIII 制限部位を有するように設計した。L鎖V領域のための前方プライマー (配列番号: 30) 及びH鎖V領域のための前方プライマー (配列番号: 31) は、J領域の末端をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライズドナー配列及びBamHI制限部位を付加するように設計した。

【0127】20mM Tris-HCl (pH8.2)、10mM KCl、6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1% Triton X-100、100μM dNTPs、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、100pmole ずつの各プライマー、100ngの鋳型DNA (pUC-VL又はpUC-VH)、及び2.5UのAmpliTaq酵素を含有する100μlのPCR反応混合物を50μlの鉱油で覆い、94℃にて3分間最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間のサイクルを30回行い、最後に72℃にて10分間インキュベートした。

【0128】PCR生成物を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF-VL-gκに、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF-VH-gγ1にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-chWS4L-gκ、HEF-chWS4H-gγ1と命名した。

【0129】COS細胞へのトランスフェクション  
キメラWS-4抗体の一過性発現を観察するため、前記

発現ベクターをCOS細胞において試験した。HEF-chWS4L-gκならびにHEF-chWS4H-gγ1をGene Pulser装置 (BioRad社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS細胞に同時形質転換した。各DNA (10μg) を、PBS中1×10<sup>7</sup>細胞/mlの0.8mlのアリコートに加え、1.5kV、25μFの容量にてパルスを与えた。

【0130】室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、5%のγグロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液 (GIBCO社製) 15mlに懸濁し、組織培養シャーレに添加した。96時間のインキュベーションの後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、直径0.45μmのディスクフィルター (Gelman Science社製) にて濾過した。

##### 【0131】ELISA

抗原結合測定および抗体濃度測定のためのELISAプレートを決定的に調整した。抗原結合活性測定のためのELISAプレートは次のようにして調製した。96穴プレート (Nunc社製) の各ウェルを、濃度2μg/mlで固着化バッファー (0.1M 炭酸水素ナトリウム、0.02% アジ化ナトリウム) に溶解したヤギ抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体 (R&D systems社製) 100μlで固着化し、希釈バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.2, 1%ウシ血清アルブミン (BSA), 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.02% アジ化ナトリウム) 200μlでブロッキングの後、濃度5ng/ml組換えヒトIL-8 (Amersham社製) 100μlを添加した。

【0132】キメラ抗体の精製サンプル、あるいはこれらを発現させたCOS細胞の培養上清を順次希釈して、各ウェルに加え、次に濃度1μg/mlのアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO社製) 100μlを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液 (1mg/ml p-ニトロフェニル磷酸) を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。

【0133】抗体濃度測定には、96穴プレートを濃度1μg/mlヤギ抗ヒトIgG抗体 (TAGO社製) 100μlで固着化し、ブロッキングの後、キメラ抗体の精製サンプル、あるいはこれらを発現させたCOS細胞の培養上清を順次希釈して、各ウェルに加え、次に濃度1μg/mlのアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗-



ヒトIgG抗体(TAGO社製)100 $\mu$ lを加えた。インキュベーション及び洗浄の後、基質溶液(1mg/ml p-ニトロフェニル燐酸、Sigma社製)を加え、次に405nmでの吸光度を測定した。その結果、キメラ抗体WS-4がIL-8に特異的に結合したことから、このキメラ抗体がマウスモノクローナル抗体WS-4のV領域の正しい構造を有することが示唆された(図2を参照のこと)。

【0134】なお、前記プラスミドHEF-chWS4L-g $\kappa$ を有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (HEF-chWS4L-g $\kappa$ )、および前記プラスミドHEF-chWS4H-g $\gamma$ 1を有する大腸菌は*Escherichia coli* JM109(HEF-chWS4H-g $\gamma$ 1)として工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成6年7月12日に各々FERM BP-4739、およびFERM BP-4740としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 【0135】実施例5. 再構成ヒトWS-4抗体の作製

再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の作製

再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードするDNAを次の様にして設計した。ヒト抗体VDH26のFR1~3およびヒト抗体4B4のFR4をコードするそれぞれ既知のDNA配列をマウスWS-4抗体H鎖V領域のCDRをコードするDNA配列が連結されるように再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

【0136】次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライスドナー配列をそれぞれ付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。こうして設計したDNA配列をほぼ均等な4本のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピュータ解析した。

【0137】4本のオリゴヌクレオチド配列を配列番号:32~35に示す。これらのオリゴヌクレオチドは113~143塩基の長さを有し、隣接する2本のオリゴヌクレオチドは互いに20塩基のオーバーラップ領域を有する。4本のオリゴヌクレオチドの内HF1(配列番号:32)、HF3(配列番号:34)はセンスDNA配列を有し、そして他のHF2(配列番号:33)、HF4(配列番号:35)はアンチセンスDNA配列を有する。これらのオリゴヌクレオチドを自動DNA合成装置(Applied Biosystems社)によって合成した。

【0138】また、これら4本のオリゴヌクレオチドのPCR法によるアッセンブリーの方法を図3に記す。約

100ngずつのHF1とHF2、HF3とHF4を組み合わせて、2.5uのPfu DNAポリメラーゼを含有する最終容量98 $\mu$ lのPCR反応液に添加した。94 $^{\circ}$ Cにて3分間の最初の変性の後、94 $^{\circ}$ Cにて2分間、55 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間を1サイクルとし、これを2サイクル行った。

【0139】PCR反応液の半量を相互に交換したのち、さらに2サイクルのインキュベーションを行った。100pmoleずつのRVH5'プライマー(配列番号:36)及びRVH3'プライマー(配列番号:37)を外側プライマーとして添加した後、PCR反応液を50 $\mu$ lの鉱油で覆い、そして94 $^{\circ}$ Cにて3分間の最初の変性の後、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間の45サイクルを行い、そして次に72 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートした。

【0140】約450塩基対のDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-VH-g $\gamma$ 1にクローニングした。EF-1プライマー(配列番号:66)およびHIPプライマー(配列番号:67)を用いてDNA配列決定の後、正しいH鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVHa-g $\gamma$ 1と命名した。本プラスミドHEF-RVHa-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:38に示す。

【0141】再構成ヒトWS-4抗体H鎖V領域の各バージョン「b」、「c」、「d」、「e」、「f」、「g」、「h」を以下のようにして作製した。バージョン「b」(RVHb)は、47位のロイシンがトリプトファンに変異するように設計した変異原プライマーLTW1(配列番号:39)およびLTW-2(配列番号:40)を用い、両端を規定するプライマーとしてはRVH5'(配列番号:36)およびRVH3'(配列番号:37)を用いて、プラスミドHEF-RVHa-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVHb-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHb-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:41に示す。

【0142】バージョン「c」は、41位のグルタミンがプロリンに変異するように設計した変異原プライマーQTP1(配列番号:42)およびQTP2(配列番号:43)を用い、プラスミドHEF-RVHa-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVHc-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHc-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号:44に示す。

【0143】バージョン「d」は、変異原プライマーとしてQTP1およびQTP2を用い、プラスミドHEF-RVHb-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとしてプラスミドHE

43

F-RVHd-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHd-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：45に示す。バージョン

「e」は、40位のアラニンがプロリンに変異するように設計した変異原プライマーATP1（配列番号：46）およびATP2（配列番号：47）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHe-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHe-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域に含まれるアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：48に示す。

【0144】バージョン「f」は、44位のグリシンがアラニンに変異するように設計した変異原プライマーGTA1（配列番号：49）およびGTA2（配列番号：50）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHf-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHf-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：51に示す。

【0145】バージョン「g」は、67位のロイシンがフェニルアラニンに変異するように設計した変異原プライマーLTF1（配列番号：52）およびLTF2（配列番号：53）を用い、プラスミドHEF-RVHd-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHg-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHg-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：54に示す。

【0146】バージョン「h」は、変異原プライマーとしてLTF1およびLTF2を用い、プラスミドHEF-RVHb-g $\gamma$ 1を鋳型DNAとして増幅し、プラスミドHEF-RVHh-g $\gamma$ 1を得た。本プラスミドHEF-RVHh-g $\gamma$ 1に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：55に示す。

【0147】再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域の作製再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域をコードするDNAを次のようにして設計した。ヒト抗体REIのFRをコードするDNA配列とマウスWS-4抗体L鎖V領域のCDRをコードするDNA配列が連結されるように再構成ヒトWS-4抗体L鎖V領域をコードする全長DNAを設計した。

【0148】次に、このDNA配列のそれぞれ5'側及び3'側にHindIII認識部位/KOZAKコンセンサス配列及びBamHI認識部位/スプライドナー配列をそれぞれ付加して、HEF発現ベクターに挿入できるようにした。こうして設計したDNA配列をほぼ均等な長さの4本のオリゴヌクレオチドに分け、そして次に、これらのオリゴヌクレオチドのアセンブリーを妨害する可能性のあるオリゴヌクレオチド中の二次構造についてコンピューター解析した。

【0149】4本のオリゴヌクレオチド配列を配列番

44

号：56～59に示す。これらのオリゴヌクレオチドは106～124塩基の長さを有し、隣接する2本のオリゴヌクレオチドは互いに19～23塩基のオーバーラップ領域を有する。4本のオリゴヌクレオチドの内LF1

（配列番号：56）、LF3（配列番号：58）はセンスDNA配列を有し、そして他のLF2（配列番号：57）、LF4（配列番号：59）はアンチセンスDNA配列を有する。これらオリゴヌクレオチドを前記のHF1～4と同様の方法で合成した。

【0150】アッセムブリーは、100ngずつの4種のオリゴヌクレオチド及び5uのAmpliTaqを含有する98 $\mu$ lのPCR混合物を、94℃にて3分間の最初の変性の後、94℃にて2分間、55℃にて2分間及び72℃にて3分間を1サイクルとし、これを2サイクル行なった。100pmoleずつのRVL5'プライマー（配列番号：60）及びRVL3'プライマー（配列番号：61）を外プライマーとして添加した後、PCR反応液を50 $\mu$ lの鉱油で覆い、そして94℃にて3分間の最初の変性の後、94℃にて1分間、55℃にて1分間及び72℃にて1分間を1サイクルとしてこれを30サイクルを行い、そして次に72℃にて10分間インキュベートした（図3参照）。

【0151】約400塩基対のDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、HindIII及びBamHIにより消化し、そして次にHEF発現ベクターHEF-VL-g $\kappa$ にクローニングした。EF-1プライマー（配列番号：66）およびKIPプライマー（配列番号：68）を用いてDNA配列決定の後、正しいL鎖V領域のアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをHEF-RVL a-g $\kappa$ と命名した。本プラスミドHEF-RVL a-g $\kappa$ に含まれるH鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：62に示す。

【0152】バージョン「b」（RVLb）は、71位のフェニルアラニンがチロシンに変異するように設計した変異原プライマーFTY1（配列番号：63）およびFTY2（配列番号：64）を用い、両端を規定するプライマーとしてはRVL5'（配列番号：60）およびRVL3'（配列番号：61）を用いて、プラスミドHEF-RVL a-g $\kappa$ を鋳型DNAとして、PCR法により増幅し、プラスミドHEF-RVL b-g $\kappa$ を得た。本プラスミドHEF-RVL b-g $\kappa$ に含まれるL鎖V領域のアミノ酸配列および塩基配列を配列番号：65に示す。

【0153】再構成ヒトWS-4抗体の各鎖の抗原結合活性を評価するため、まず、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョンのための発現ベクターHEF-RVL a-g $\kappa$ とキメラWS-4抗体H鎖のための発現ベクターHEF-chWS4H-g $\gamma$ 1とによりCOS細胞を前記のようにして同時トランスフェクションし、前記

のようにして培養上清を回収した後、前記実施例4 E L I S A に記載のとおりの方法を用いて、産生された抗体について産生抗体量および抗原結合活性を測定した。この結果を図4に示す。図4に示すように陽性対照としてのキメラ抗体(c h L / c h H)および再構成L鎖とキメラH鎖とからなる抗体(R V L a / c h H)との間には抗原結合性に差がないことが確認された。

【0154】同時に、キメラWS-4抗体L鎖のための発現ベクターH E F - c h W S 4 L - g κと再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「a」バージョンとの組み合わせを評価するため、両者をC O S細胞に同時トランスフェクションし、前記実施例4 E L I S A に記載のとおりの方法を用いて、得られた抗体について産生抗体量および抗原結合活性を測定した。その結果、この抗体(c h L / R V H a)には抗原結合活性が見られなかった(図4を参照のこと)。

【0155】前記のごとく、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)はキメラWS-4抗体L鎖と同等の結合活性を示したので、これ以後の再構成H鎖各バージョンの評価には、再構成H鎖各バージョンと再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)をC O S細胞に同時トランスフェクションすることにより行なった。

【0156】その結果、「b」、「d」、「e」、「f」、「g」、「h」の各再構成H鎖バージョンを有する抗体は、陽性対照であるキメラWS-4抗体(c h L / c h H)に匹敵する程度の抗原結合性を示し、この組み合わせがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。しかし、産生量については、「g」バージョン(R V H g)以外はいずれもキメラWS-4抗体(c h L / c h H)より低かった。なお、H鎖バージョン「c」を有する抗体には抗原結合活性が見られなかった(図5を参照のこと)。

【0157】このことから、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)ならびに再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「g」バージョン(R V H g)を有する抗体は、良好な抗原結合性を示す機能的抗原結合部位を再形成し、C O S細胞に同時トランスフェクションすることによりキメラWS-4抗体(c h L / c h H)に匹敵する程度の産生量を示すことが示唆された。

【0158】次に、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「b」バージョン(R V L b)を用いて、H鎖各バージョンとC O S細胞に同時トランスフェクションし、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「b」バージョン(R V L b)の評価をおこなった。その結果、再構成ヒトWS-4抗体H鎖「g」バージョンを有する抗体(R V L b / R V H g)だけが、陽性対照であるキメラWS-4抗体(c h L / c h H)に匹敵する程度の抗原結合性を示し、この組み合わせがヒト抗体における機能的抗原結合部位を形成することが示唆された。また、産生量について

も、「g」バージョン(R V H g)以外はいずれもキメラWS-4抗体(c h L / c h H)より低かった(図6を参照のこと)。

【0159】前記の評価において、キメラWS-4抗体(c h L / c h H)に匹敵する産生量とI L - 8に対する結合活性を示した2種の再構成ヒト抗体(R V L a / R V H gとR V L b / R V H g)をそれぞれプロテインAカラムで精製して、実施例4 E L I S A に記載の方法で結合活性をより正確に評価した。その結果、キメラWS-4抗体(c h L / c h H)、R V L a / R V H g抗体並びにR V L b / R V H g抗体のいずれも同程度の結合活性を示した(図7参照のこと)。

【0160】このことから、再構成ヒトWS-4抗体L鎖の「a」バージョン(R V L a)あるいは「b」バージョン(R V L b)と、再構成ヒトWS-4抗体H鎖の「g」バージョン(R V H g)を有する抗体は、良好な抗原結合性を示す機能的抗原結合部位を再形成し、C O S細胞に同時トランスフェクションすることによりキメラWS-4抗体(c h L / c h H)に匹敵する程度の産生量を示すことが示唆された。

【0161】再構成ヒトWS-4抗体のL鎖「a」バージョン(R V L a)と同H鎖「g」バージョン(R V H g)、または同L鎖「b」バージョン(R V L b)と同H鎖「g」バージョン(R V H g)からなる再構成ヒト抗体のI L - 8レセプターに対するI L - 8結合阻害活性を、リガンドレセプター結合阻害アッセイにより評価した。

【0162】健常人よりヘパリン採血した約100mlの血液を、15mlのM o n o - P o l y分離溶液(I C N B i o m e d i c a l s社製)に35mlずつ重層し、添付の指示書に従い遠心分離をおこなってヒト好中球層を単離した。この細胞を1% B S A添加R P M I - 1 6 4 0培地にて洗浄した後、混入した赤血球を150mMの塩化アンモニウム溶液にて除去した。これを遠心分離した後、細胞を1% B S A添加R P M I - 1 6 4 0培地にて洗浄し、 $2 \times 10^7$  Cells/mlの細胞濃度になるように再懸濁した。この細胞懸濁液の好中球の含有率は、サイトスピン(S h a n d o n社)による塗抹標本をD i f f - Q u i k (ミドリ十字社製)染色して測定した結果95%以上であった。

【0163】上記好中球懸濁液を遠心分離し、結合バッファー(1% B S A及び0.1%アジ化ナトリウムを含むD - P B S)にて細胞濃度 $2 \times 10^7$  Cells/mlになるように再懸濁した。この時、好中球上のF cレセプターをあらかじめ飽和する目的で、本発明のヒト抗体と同一のF c部分を有するS K 2キメラ抗体(国際特許出願出願番号P C T / J P 9 4 / 0 0 8 5 9参照)とその抗原であるヒトI L - 6をそれぞれ濃度約 $50 \mu\text{g/ml}$ および約 $40\text{ng/ml}$ になるように添加し、氷温中で30分間インキュベートした。

【0164】<sup>125</sup>Iで放射標識したIL-8 (74TBq/mmol, Amersham社製)と未標識IL-8 (Amersham社製)を各濃度が4ng/mlになるように結合バッファーにて混合し調製した。キメラWS-4抗体 (chL/chH)、再構成ヒト抗体 (RVLa/RVHgおよびRVLb/RVHg)、陰性対照のヒト抗体 (PAESEL+LOREI社製)あるいは陽性対照のマウスWS-4抗体のそれぞれを結合バッファーにて濃度2000ng/mlから約8ng/mlまで2倍段階希釈した。IL-8溶液ならびに各抗体溶液をそれぞれ50μlずつ混合し氷温中で30分間インキュベートした。その後、上記好中球懸濁液100μlを添加し、更に15分毎に攪拌しながら氷温中で1時間インキュベートした。インキュベート後、この細胞懸濁液を200μlの20%サッカロース溶液に重層し、遠心、凍結させた。細胞に結合したIL-8を測定するため、細胞沈渣を切断し、γ-カウンター (アロカ社製)で放射活性を測定した。その結果を図8に示す。

【0165】再構成ヒトWS-4抗体のL鎖「a」バージョン (RVLa)と同H鎖「g」バージョン (RVHg)、または同L鎖「b」バージョン (RVLb)と同H鎖「g」バージョン (RVHg)を有する抗体は、IL-8レセプターに対するIL-8の結合に対して、キメラ抗体 (chL/chH)と同程度の結合阻害活性を有することが明らかになった。

【0166】なお、前記プラスミドHEF-RVLa-gκを有する大腸菌は*Escherichia coli* DH5α (HEF-RVLa-gκ)、およびプラスミドHEF-RVHg-gγ1を含有する大腸菌は*Escherichia coli* JM109 (HEF-RVHg-gγ1)として工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成\*

## 配列

ACTAGTCGAC ATGAAGTTGC CTGTTAGGCT GTTGGTGCTG

【0170】配列番号：2

配列の長さ：39

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

## 配列

ACTAGTCGAC ATGGAGWCAG ACACACTCCT GYTATGGGT

【0171】配列番号：3

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

## 配列

ACTAGTCGAC ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGS GTTG

【0172】配列番号：4

配列の長さ：43

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

\*6年7月12日に、各々FERM BP-4738および、FERM BP-4741としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

【0167】参考例1. ハイブリドーマWS-4の作製

抗ヒトIL-8モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ヒトIL-8で免疫したBALB/cマウスの脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞P3X63-Ag8.653をポリエチレングリコールを用いた常法により融合して作製した。ヒトIL-8と結合する活性を指標としたスクリーニングを行い、ハイブリドーマWS-4を樹立した (Ko, Y-C.ら, J. Immunol. Methods, 149, 227-235, 1992)。

【0168】

【発明の効果】本発明はヒトIL-8に対する再構成ヒト抗体を提供し、この抗体においてはヒト抗体のV領域のCDRがヒトIL-8に対するマウスモノクローナル抗体のCDRにより置き換えられている。この再構成ヒト抗体の大部分がヒト抗体に由来し、そしてCDRは元来、抗原性が低いことから、本発明の再構成ヒト抗体はヒトに対する抗原性が低く、そしてそれ故に医学療用法用として期待される。

【0169】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MKV1

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MKV2

※

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MKV3

★

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MKV4

50

49	50
配列	
ACTAGTCGAC ATGAGGRCCC CTGCTCAGWT TYTTGGMWTC TTG	43
【0173】配列番号：5	*トポロジー：直鎖状
配列の長さ：40	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV5
鎖の数：一本鎖	*
配列	
ACTAGTCGAC ATGGATTTWC AGGTGCAGAT TWTGAGCTTC	40
【0174】配列番号：6	※トポロジー：直鎖状
配列の長さ：37	10 配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV6
鎖の数：一本鎖	※
配列	
ACTAGTCGAC ATGAGGTKCY YTGYSAGYT YCTGRGG	37
【0175】配列番号：7	★トポロジー：直鎖状
配列の長さ：41	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV7
鎖の数：一本鎖	★
配列	
ACTAGTCGAC ATGGGCWTCAGATGAGTC ACAKWYYCWG G	41
【0176】配列番号：8	☆トポロジー：直鎖状
配列の長さ：41	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV8
鎖の数：一本鎖	☆
配列	
ACTAGTCGAC ATGTGGGGAY CTKTTTYCMM TTTTCAATT G	41
【0177】配列番号：9	◆トポロジー：直鎖状
配列の長さ：35	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV9
鎖の数：一本鎖	◆30
配列	
ACTAGTCGAC ATGGTRTCCW CASCTCAGTT CCTTG	35
【0178】配列番号：10	*トポロジー：直鎖状
配列の長さ：37	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV10
鎖の数：一本鎖	*
配列	
ACTAGTCGAC ATGTATATAT GTTTGTTGTC TATTTCT	37
【0179】配列番号：11	※トポロジー：直鎖状
配列の長さ：38	40 配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKV11
鎖の数：一本鎖	※
配列	
ACTAGTCGAC ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCC	38
【0180】配列番号：12	トポロジー：直鎖状
配列の長さ：27	配列の種類：合成DNA
配列の型：核酸	配列の名称：MKC
鎖の数：一本鎖	
配列	
GGATCCCGGG TGGATGGTGG GAAGATG	27

【0181】配列番号：13

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGAAATGCA GCTGGGTCAT STTCTTC

37

【0182】配列番号：14

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGGGATGGA GCTRTATCAT SYTCTT

36

【0183】配列番号：15

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGAAGWTGT GGTAAACTG GGTITTT

37

【0184】配列番号：16

配列の長さ：35

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGRACTTTG GGYTCAGCTT GRITTT

35

【0185】配列番号：17

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGGACTCCA GGCTCAATTT AGTTTTCTT

40

【0186】配列番号：18

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGGCTGTCY TRGSGCTRCT CTTCTGC

37

【0187】配列番号：19

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGGRATGGA GCKGGRTCTT TMTCTT

36

【0188】配列番号：20

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

ACTAGTCGAC ATGAGAGTGC TGATTCTTTT GTG

33

【0189】配列番号：21

配列の長さ：40

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV1

\*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV2

※10

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV3

★

☆トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV4

☆

◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV5

◆

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV6

\*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV7

※40

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV8

★

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

53

54

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACTAGTCGAC ATGGMTTGGG TGTGGAMCTT GCTATTCCTG

【0190】配列番号：22

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

\*配列の名称：MHV9

\*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV10

※

配列

ACTAGTCGAC ATGGGCAGAC TTACATTCTC ATTCCTG

【0191】配列番号：23

配列の長さ：38

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV11

★

配列

ACTAGTCGAC ATGGATTTTG GGCTGATTTT TTTTATTG

【0192】配列番号：24

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHV12

☆20

配列

ACTAGTCGAC ATGATGGTGT TAAGTCTTCT GTACCTG

【0193】配列番号：25

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

◆トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：MHC

◆

配列

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG

【0194】配列番号：26

配列の長さ：382

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の名称：WS4VL

起源

30 生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-WS4-VL

特徴： 1..60 sig peptide

61..382 mat peptide

配列

ATG AGT GTG CTC ACT CAG GTC CTG GGG TTG CTG CTG CTG TGG CTT ACA

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Leu Thr

-20 -15 -10 -5

GGT GCC AGA TGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA GCC TCC CTA TCT

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser

-1 1 5 10

GCA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT CGA GCA AGT GAG ATT

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile

15 20 25

ATT TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA TCT CCT

Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro

30 35 40

CAG CTC CTG GTC TAT AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGT GTG TCA TCA

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser



55 56  
 45 50 55 60  
 AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGC ACA CAG TTT TCT CTG CGG ATC AGC 288  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Arg Ile Ser  
 65 70 75  
 AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GGG AGT TAT TAC TGT CAA CAT CAT TTT 336  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Phe  
 80 85 90  
 GGT TTT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA CTC AAA C 382  
 Gly Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 95 100 105

【0195】配列番号：27

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の名称：WS4VH

\*起源

生物名：マウス

直接の起源

クローン：pUC-WS4-VH

特徴：1..57 sig peptide

58..424 mat peptide

\*

配列

ATG AAG TTG TGG TTA AAC TGG GTT TTT CTT GTG ACA CTT TTA AAT GGT 48  
 Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly  
 -19 -15 -10 -5  
 ATC CAG TGT GAG GTG AAA CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATA CAG 96  
 Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Ile Gln  
 -1 1 5 10  
 CCT GGG GAT TCT CTG AGA CTC TCC TGT GTA ACC TCT GGG TTC ACC TTC 144  
 Pro Gly Asp Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Thr Phe  
 15 20 25  
 AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGA AAG GCA CTT 192  
 Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu  
 30 35 40 45  
 GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240  
 Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu  
 50 55 60  
 TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGT CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCC 288  
 Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
 65 70 75  
 CAA AGC ATC CTC TAT CTT CAA ATG AAC ACC CTG AGA GGT GAG GAC AGT 336  
 Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ser  
 80 85 90  
 GCC ACT TAT TAC TGT GCA CGA GAG AAC TAT AGG TAC GAC GTA GAG CTT 384  
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu  
 95 100 105  
 GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA G 424  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 110 115 120

【0196】配列番号：28

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：chVL後方プライマー

- 57  
ACAAAGCTTC CACCATGAGT GTGCTCACTC AGGT  
【0197】配列番号：29  
配列の長さ：37  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
\*トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
配列の名称：c h V H 後方プライマー  
\*
- 58  
34  
配列  
GATAAGCTTC CACCATGAAG TTGTGGTTAA ACTGGGT  
【0198】配列番号：30  
配列の長さ：37  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
\*トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
10 配列の名称：c h V L 前方プライマー  
※
- 37  
配列  
CTTGGATCCA CTCACGTTTG AGTCCAGCT TGGTGCC  
【0199】配列番号：31  
配列の長さ：37  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
★トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
配列の名称：c h V H 前方プライマー  
★
- 37  
配列  
GTCGGATCCA CTCACCTGCA GAGACAGTGA CCAGAGT  
【0200】配列番号：32  
配列の長さ：137  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
20 ☆トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
配列の名称：H F 1  
☆
- 50  
100  
137  
配列  
TAAGCTTCCA CCATGGAGTT TGGGCTGAGC TGGGTTTTCC TTGTGCTAT  
TTTAAAGGGT GTCCAGTGTG AAGTCAGCT GTTGGAGTCT GGGGAGGCT  
TGGTCCAGCC TGGGGTTCT CTGAGACTCT CATGTGC  
【0201】配列番号：33  
配列の長さ：143  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
◆トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
30 配列の名称：H F 2  
◆
- 50  
100  
143  
配列  
GCACTGTACT CTCTGTGTA ACCATTGGCT TTGTTTCTAA TGAGACCCAC  
CAACTCTAGC CCTTCCCTT GAGCTTGGCG GACCCAGCTC AGGTAGTAAT  
CACTGAAGGT GAATCCAGAG GCAGCACATG AGAGTCTCAG AGA  
【0202】配列番号：34  
配列の長さ：113  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
\*トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
配列の名称：H F 3  
\*
- 50  
100  
113  
配列  
TACACAAGAG AGTACAGTGC ATCTGTGAAG GGCAGACTTA CCATCTCAAG  
AGAAGATTCA AAGAACACGC TGTATCTGCA AATGAGCAGC CTGAAAACCG  
AAGACTTGGC CGT  
【0203】配列番号：35  
配列の長さ：117  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：合成DNA  
配列の名称：H F 4
- 50  
100  
配列  
TCGGATCCAC TCACCTGAGG AGACGGTGAC CAGGGTTCCC TGGCCCCAGT  
AAGCAAGCTC TACGTCGTAG CGATAGTTCT CTCTAGCACA GTAATACAG

59

60

GCCAAGCTTT CGGTTTT

117

【0204】配列番号：36

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVH5'プライマー

\*

配列

GATAAGCTTC CACCATGGAG TTTGGGCTGA GCTGGGT

37

【0205】配列番号：37

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

10 配列の名称：RVH3'プライマー

※

配列

GTCGGATCCA CTCACCTGAG GAGACGGTGA C

31

【0206】配列番号：38

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHa

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVHa-gyl

アミノ酸 -19--1:leader

アミノ酸 1-30:FR1

アミノ酸 31-35:CDR1

アミノ酸 36-49:FR2

アミノ酸 50-68:CDR2

20 アミノ酸 69-100:FR3

アミノ酸 101-111:CDR3

アミノ酸 112-122:FR4

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

61

62

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0207】配列番号：39

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：L T W 1

\*

配列

GGCTAGAGTG GGTGGTCTC ATTAGAAACA AAGC

34

【0208】配列番号：40

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：合成DNA

配列の名称：L T W 2

※

配列

GAGACCCACC CACTCTAGCC CTTCCCTTG AGCTTG

36

【0209】配列番号：41

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：R V H b

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：H E F - R V H b - g y 1

アミノ酸 - 19 - - 1 : l e a d e r

アミノ酸 1 - 30 : F R 1

アミノ酸 31 - 35 : C D R 1

アミノ酸 36 - 49 : F R 2

20 アミノ酸 50 - 68 : C D R 2

アミノ酸 69 - 100 : F R 3

アミノ酸 101 - 111 : C D R 3

アミノ酸 112 - 122 : F R 4

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT

48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19

-15

-10

-5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG

96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1

5

10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC

144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15

20

25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA

192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu

30

35

40

45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG

240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50

55

60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA

288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65

70

75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG

336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80

85

90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT

384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95

100

105

63

64

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G

424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110

115

120

【0210】配列番号：42

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

\*トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：QTP1

\*

配列

TGGGTCCGCC AAGCTCCAGG GAAAGGGCTA GA

32

【0211】配列番号：43

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10 ※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：QTP2

※

配列

TCTAGCCCTT TCCCTGGAGC TTGGCGGACC CA

32

【0212】配列番号：44

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHc

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVHc- $\gamma$ 1

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

アミノ酸 31-35: CDR1

20 アミノ酸 36-49: FR2

アミノ酸 50-68: CDR2

アミノ酸 69-100: FR3

アミノ酸 101-111: CDR3

アミノ酸 112-122: FR4

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT

48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG

96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC

144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA

192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TTG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG

240

Glu Leu Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA

288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG

336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT

384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

65  
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
110 115 120

66

424

【0213】配列番号：45

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHd

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

\*クローン：HEF-RVHd-gy1

アミノ酸 -19-1:leader

アミノ酸 1-30:FR1

アミノ酸 31-35:CDR1

アミノ酸 36-49:FR2

アミノ酸 50-68:CDR2

10 アミノ酸 69-100:FR3

アミノ酸 101-111:CDR3

アミノ酸 112-122:FR4

\*

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0214】配列番号：46

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：ATP1

※

配列

TGGGTCCGCC AACCTCCAGG GAAAGG 26

【0215】配列番号：47

配列の長さ：26

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

67

68

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCTTTCCCTG GAGGTTGGCG GACCCA

【0216】配列番号：48

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHe

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

\*配列の名称：ATP2

\*

26

※クローン：HEF-RVHe- $\gamma$ 1

アミノ酸 -19--1:leader

アミノ酸 1-30:FR1

アミノ酸 31-35:CDR1

アミノ酸 36-49:FR2

10 アミノ酸 50-68:CDR2

アミノ酸 69-100:FR3

アミノ酸 101-111:CDR3

アミノ酸 112-122:FR4

※

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA CCT CCA GGG AAA GGG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0217】配列番号：49

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：GTA1

★

配列

CAAGCTCCAG GGAAAGCGCT AGAGTGGGT 29

【0218】配列番号：50

配列の長さ：29

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖



69

70

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ACCCACTCTA GCGCTTTCCC TGGAGCTTG

【0219】配列番号：51

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHf

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

\*配列の名称：GTA2

\*

※クローン：HEF-RVHf- $\gamma$ 1  
 アミノ酸 -19--1: leader  
 アミノ酸 1-30: FR1  
 アミノ酸 31-35: CDR1  
 アミノ酸 36-49: FR2  
 10 アミノ酸 50-68: CDR2  
 アミノ酸 69-100: FR3  
 アミノ酸 101-111: CDR3  
 アミノ酸 112-122: FR4

※

配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT 48

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

-1 1 5 10

CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC 144

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

15 20 25

AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GCG CTA 192

Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu

30 35 40 45

GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG 240

Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu

50 55 60

TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA CTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA 288

Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser

65 70 75

AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG 336

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu

80 85 90

GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT 384

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu

95 100 105

GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G 424

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

【0220】配列番号：52

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：LTF1

★

配列

GTGAAGGCA GATTACCAT CTC

【0221】配列番号：53

50 配列の長さ：23

23

配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状

\*配列の種類：合成DNA  
配列の名称：LTF2

\*

## 配列

GAGATGGTAA ATCTGCCCTT CAC

【0222】配列番号：54

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHg

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

23  
※クローン：HEF-RVHg- $\gamma$ 1  
アミノ酸 -19--1: leader  
アミノ酸 1-30: FR1  
アミノ酸 31-35: CDR1  
10 アミノ酸 36-49: FR2  
アミノ酸 50-68: CDR2  
アミノ酸 69-100: FR3  
アミノ酸 101-111: CDR3  
アミノ酸 112-122: FR4

※

## 配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
-1 1 5 10	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
15 20 25	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
50 55 60	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
65 70 75	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
80 85 90	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
95 100 105	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0223】配列番号：55

配列の長さ：424

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：RVHh

起源

生物名：マウス及びヒト

直接の起源

クローン：HEF-RVHh- $\gamma$ 1

アミノ酸 -19--1: leader

アミノ酸 1-30: FR1

50 アミノ酸 31-35: CDR1

	73		74
アミノ酸	36-49:FR2	*アミノ酸	101-111:CDR3
アミノ酸	50-68:CDR2	アミノ酸	112-122:FR4
アミノ酸	69-100:FR3	*	

## 配列

ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTT GTT GCT ATT TTA AAG GGT	48
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
-19 -15 -10 -5	
GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
-1 1 5 10	
CCT GGG GGT TCT CTG AGA CTC TCA TGT GCT GCC TCT GGA TTC ACC TTC	144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
15 20 25	
AGT GAT TAC TAC CTG AGC TGG GTC CGC CAA GCT CAA GGG AAA GGG CTA	192
Ser Asp Tyr Tyr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Gln Gly Lys Gly Leu	
30 35 40 45	
GAG TGG GTG GGT CTC ATT AGA AAC AAA GCC AAT GGT TAC ACA AGA GAG	240
Glu Trp Val Gly Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Arg Glu	
50 55 60	
TAC AGT GCA TCT GTG AAG GGC AGA TTT ACC ATC TCA AGA GAA GAT TCA	288
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asp Ser	
65 70 75	
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC CTG AAA ACC GAA GAC TTG	336
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Thr Glu Asp Leu	
80 85 90	
GCC GTG TAT TAC TGT GCT AGA GAG AAC TAT CGC TAC GAC GTA GAG CTT	384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asn Tyr Arg Tyr Asp Val Glu Leu	
95 100 105	
GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G	424
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

【0224】配列番号: 56

配列の長さ: 124

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

※トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: LF1

※

## 配列

TTGAAGCTTC CACCATGGGA TGGAGCTGTA TCATCCTCTT CTTGGTAGCA	50
ACAGCTACAG GTGTCCACTC CGACATCCAG ATGACCCAGA GCCCAAGCAG	100
CCTGAGCGCC AGCGTAGGTG ACAG	124

【0225】配列番号: 57

配列の長さ: 122

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

★トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列の名称: LF2

★

## 配列

GCATTGTAGA TCAGCAGCTT TGGAGCCTTT CCTGGCTTCT GCTGGTACCA	50
TGCTAAATAA CTGTAAATAA TCTCGCTTGC TCGACAGGTG ATGGTCACTC	100
TGTCACCTAC GCTGGCGCTC AG	122

【0226】配列番号: 58

配列の長さ: 121

配列の型: 核酸

50 鎖の数: 一本鎖

75

76

トポロジー：直鎖状

\*配列の名称：L F 3

配列の種類：合成DNA

\*

配列

AGCTGCTGAT CTACAATGCA AAAACCTTAG CAGATGGAGT GCCAAGCAGA 50

TTCAGCGGTA GCGGTAGCGG TACCGACTTC ACCTTCACCA TCAGCAGCCT 100

CCAGCCAGAG GACATCGCTA C 121

【0227】配列番号：59

※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：106

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：L F 4

鎖の数：一本鎖

※10

配列

GTAGGATCCA CTCACGTTTG ATTTGACCT TGGTCCCTTG GCCGAACGTC 50

CGAGGAAAAC CAAAATGATG TTGGCAGTAG TAGGTAGCGA TGTCCTCTGG 100

CTGGAG 106

【0228】配列番号：60

★トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：R V L 5'

鎖の数：一本鎖

★

配列

TTGAAGCTTC CACCATGGGA 20

【0229】配列番号：61

☆トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：合成DNA

配列の型：核酸

配列の名称：R V L 3'

鎖の数：一本鎖

☆

配列

GTAGGATCCA CTCACGTTTG 20

【0230】配列番号：62

クローン：HEF-RVL a-g κ

配列の長さ：379

アミノ酸 -19--1: leader

配列の型：核酸

アミノ酸 1-23: FR1

鎖の数：二本鎖

30 アミノ酸 24-34: CDR1

トポロジー：直鎖状

アミノ酸 35-49: FR2

配列の種類：合成DNA

アミノ酸 50-56: CDR2

配列の名称：R V L a

アミノ酸 57-88: FR3

起源

アミノ酸 89-97: CDR3

生物名：マウス及びヒト

アミノ酸 98-107: FR4

直接の起源

配列

ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT 48

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

-19 -15 -10 -5

GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC 96

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala

-1 1 5 10

AGC GTA GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT CGA GCA AGC GAG ATT ATT 144

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile

15 20 25

TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG 192

Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

30 35 40 45

CTG CTG ATC TAC AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGA GTG CCA AGC AGA 240

77		78
Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg		
50	55	60
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TTC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288	
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser		
65	70	75
CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAT CAT TTT GGT	336	
Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly		
80	85	90
TTT CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA C	379	
Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
95	100	105
【0231】配列番号：63	*トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：38	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	配列の名称：FTY1	
鎖の数：一本鎖	*	
配列		
AGCGGTAGCG GTACCGACTA CACCTTCACC ATCAGCAG	38	
【0232】配列番号：64	※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ：38	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	20 配列の名称：FTY2	
鎖の数：一本鎖	※	
配列		
CTGCTGATGG TGAAGGTGTA GTCGGTACCG CTACCGCT	38	
【0233】配列番号：65	クローン：HEF-RVLb-gκ	
配列の長さ：379	アミノ酸 -19--1：leader	
配列の型：核酸	アミノ酸 1-23：FR1	
鎖の数：二本鎖	アミノ酸 24-34：CDR1	
トポロジー：直鎖状	アミノ酸 35-49：FR2	
配列の種類：合成DNA	アミノ酸 50-56：CDR2	
配列の名称：RVLb	30 アミノ酸 57-88：FR3	
起源	アミノ酸 89-97：CDR3	
生物名：マウス及びヒト	アミノ酸 98-107：FR4	
直接の起源		
配列		
ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT	48	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly		
-19 -15 -10 -5		
GTC CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AGC AGC CTG AGC GCC	96	
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala		
-1 1 5 10		
AGC GTA GGT GAC AGA GTG ACC ATC ACC TGT CGA GCA AGC GAG ATT ATT	144	
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ile Ile		
15 20 25		
TAC AGT TAT TTA GCA TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA AAG GCT CCA AAG	192	
Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
30 35 40 45		
CTG CTG ATC TAC AAT GCA AAA ACC TTA GCA GAT GGA GTG CCA AGC AGA	240	
Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg		
50 55 60		
TTC AGC GGT AGC GGT AGC GGT ACC GAC TAC ACC TTC ACC ATC AGC AGC	288	

79 80  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 65 70 75  
 CTC CAG CCA GAG GAC ATC GCT ACC TAC TAC TGC CAA CAT CAT TTT GGT 336  
 Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly  
 80 85 90  
 TTT CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA C 379  
 Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105

【0234】配列番号：66

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CAGACAGTGG TTCAAAGT

【0235】配列番号：67

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GCCCCAAAGC CAAGGTC

【0236】配列番号：68

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

AACTCAATGC TTTAGCAAA

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、それぞれ本発明の抗体のL鎖およびH鎖の発現のために有用な、ヒト・エロンゲーション・ファクター-1 $\alpha$  (HEF-1 $\alpha$ ) プロモーター/エンハンサー系を含んで成る発現ベクターHEF-VL-g $\kappa$  およびHEF-VH-g $\gamma$ 1を示す。

【図2】図2は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体 (chL/chH) のヒトIL-8に対する結合能の確認のためのELISAの結果を示すグラフである。

【図3】図3は、本発明の再構成ヒトWS-4抗体のH鎖V領域の第一バージョン「a」 (RVHa)、および再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域の第一バージョン「a」 (RVLa) の各アミノ酸配列をコードするDNAを構築するためのダイアグラムである。

【図4】図4は、本発明の再構成ヒトWS-4抗体のL鎖V領域 (RVLa) ならびにH鎖V領域 (RVHa) を、それぞれキメラWS-4抗体H鎖V領域 (chH) ならびにキメラWS-4抗体L鎖V領域 (chL) とCOS細胞に発現させ、ヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体 (chL/chH) と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

\*トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：合成DNA

配列の名称：EF1

\*

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：HIP

※

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列の名称：KIP

★

【図5】図5は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のRVLaを含んでなる8種の再構成ヒトWS-4抗体 (RVLa/RVHa, RVLa/RVHb, RVLa/RVHc, RVLa/RVHd, RVLa/RVHe, RVLa/RVHf, RVLa/RVHg, RVLa/RVHh) のヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体 (chL/chH) と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

【図6】図6は、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のRVLbを含んでなる8種の再構成ヒトWS-4抗体 (RVLb/RVHa, RVLb/RVHb, RVLb/RVHc, RVLb/RVHd, RVLb/RVHe, RVLb/RVHf, RVLb/RVHg, RVLb/RVHh) のヒトIL-8に対する結合能と産生量を、COS細胞の培養上清中に産生された本発明のキメラWS-4抗体 (chL/chH) と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

【図7】図7は、精製した本発明の再構成ヒトWS-4抗体RVLa/RVHg並びにRVLb/RVHgのヒトIL-8に対する結合能を、精製した本発明のキメラWS-4抗体 (chL/chH) と比較するためのELISAの結果を示すグラフである。

50 【図8】図8は、精製した本発明の再構成ヒト型化抗体

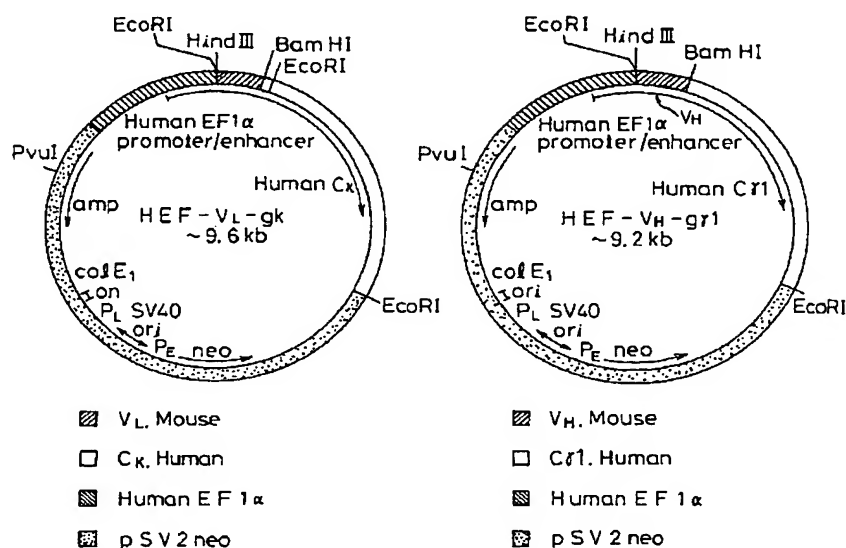
81

RVL a/RVH gならびにRVL b/RVH gのIL-8レセプターに対するIL-8の結合阻害活性をマウスWS-4抗体ならびに本発明のキメラWS-4抗体

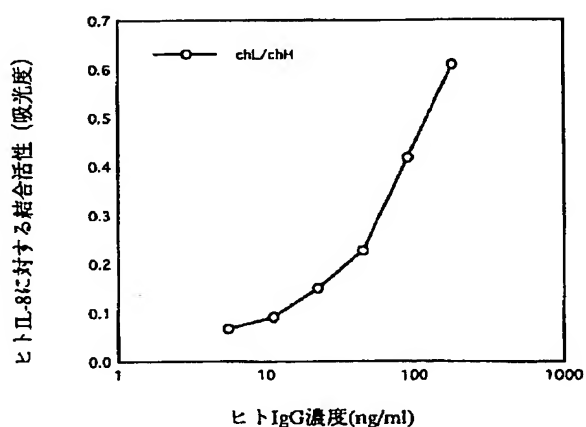
82

(chL/chH)と比較するための、リガンドレセプター結合阻害アッセイの結果を示すグラフである。

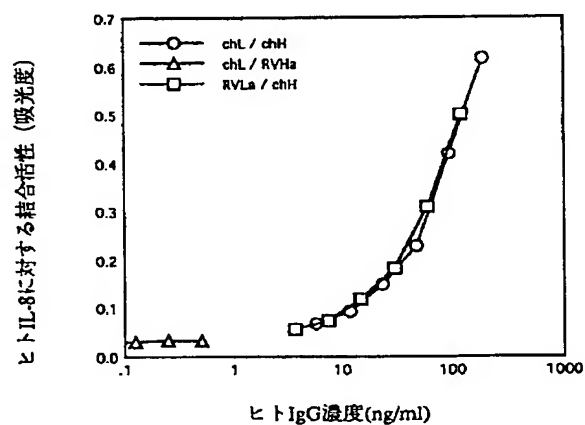
【図1】



【図2】



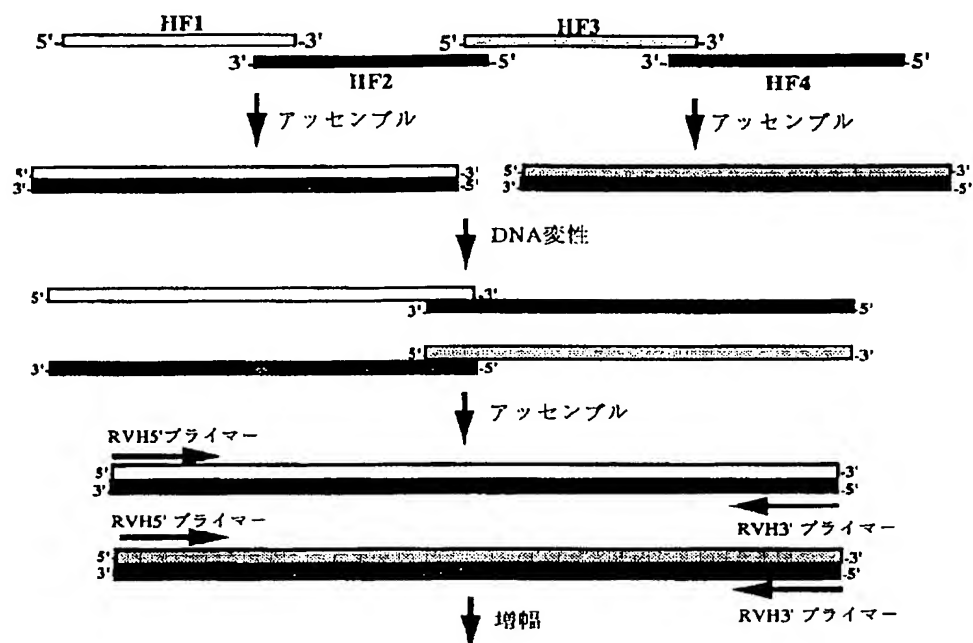
【図4】



【図 3】

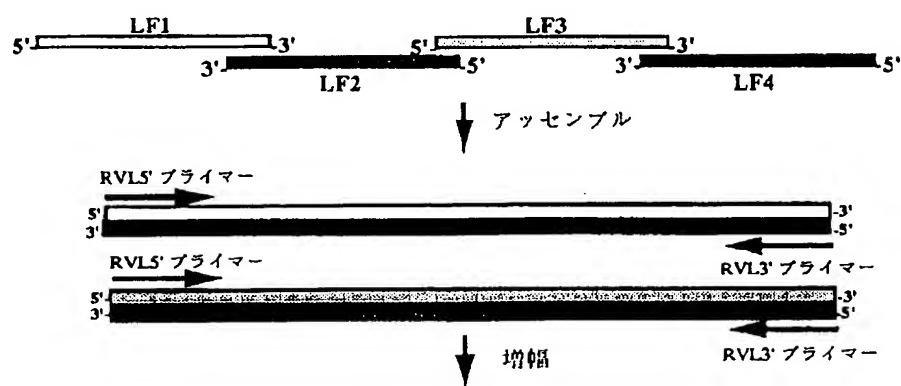
## A. 再構成ヒト抗体H鎖V領域をコードするDNAの構築

オリゴヌクレオチドの合成



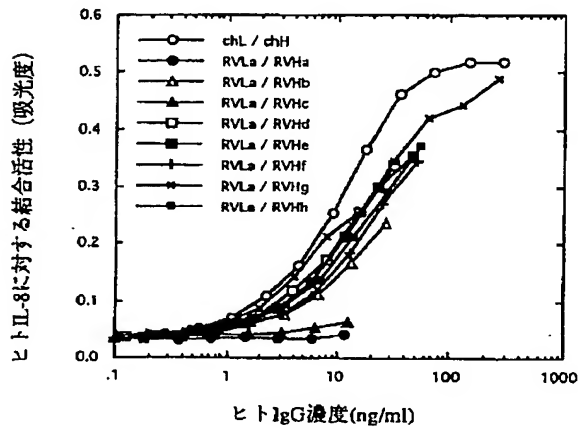
## B. 再構成ヒト抗体L鎖V領域をコードするDNAの構築

オリゴヌクレオチドの合成

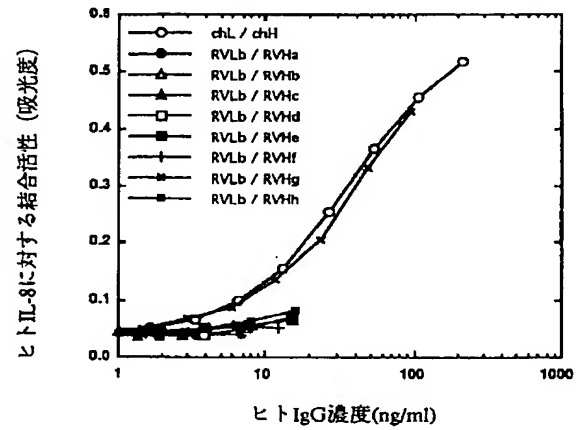




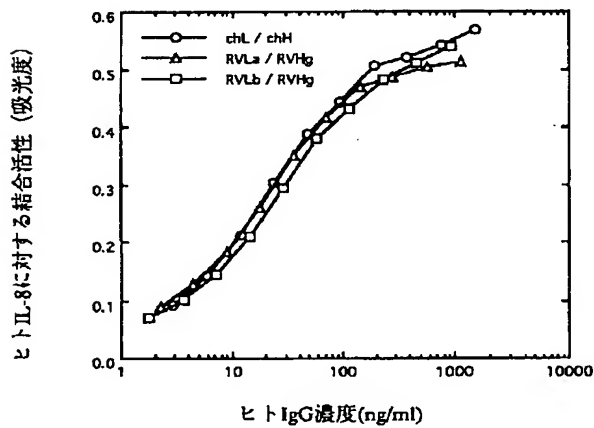
【図5】



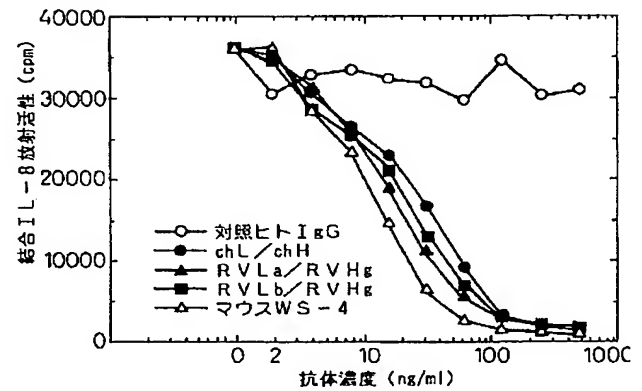
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 N 15/09

C 1 2 P 21/08

// A 6 1 K 39/395

識別記号

Z N A

A B E

A B N

A B S

庁内整理番号

9281-4B

9162-4B

9162-4B

F I

A 6 1 K 39/395

C 1 2 N 5/00

15/00

技術表示箇所

A B N

A B S U

B

C

Z N A A

(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 佐藤 功

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外  
製薬株式会社内

(72)発明者 土屋 政幸

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外  
製薬株式会社内

(72)発明者 山崎 達美  
静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外  
製薬株式会社内